

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Chemie

Studijní obor: Analytická chemie



Bc. Jakub Ederer

MOŽNOSTI ELEKTROCHEMICKÉ ANALÝZY S VYUŽITÍM
SOUSTAVY VÍCE ELEKTROD S NESPECIFICKOU
ODEZVOU

Possibilities of Electrochemical Analysis Using a System of
Electrodes With Non-Specific Response

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: Ing. Pavel Janda, CSc.

Konzultant: RNDr. Karel Nesměrák, Ph.D.

Praha 2014

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědom toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 21. května 2014.

Abstrakt

V této diplomové práci jsou prezentovány možnosti zpracování elektrochemických dat ze skupiny čtyř elektrod s neselektivní odezvou (jednoduchého senzorového pole) pro elektrochemickou analýzu s možností uplatnění dosažených výsledků při konstrukci senzorového pole typu „elektronický jazyk“. Tato jednoduchá soustava byla použita na vzorek simulující potravinářský výrobek. Elektrochemická data byla zpracována matematicky pomocí Gaussovy aproximace, dekonvoluce nebo pomocí základních matematických operací.

Klíčová slova: cyklická voltametrie, kávová kyselina, askorbová kyselina, gallová kyselina, slučování dat, zpracování dat

Abstract

The master thesis present the possibilities of processing of electrochemical data from a group of four electrodes with non-selective response (simple sensor array) for electrochemical analysis with potential application of the results achieved in the construction of the sensor field type "electronic tongue". This simple system was applied to the sample simulating the food product. Electrochemical data were processed through mathematical operations such as Gaussian approximation, deconvolution or using basic mathematical operations.

Key words: cyclic voltammetry, caffeic acid, ascorbic acid, gallic acid, data fusion, data processing

Poděkování

Děkuji především svému školiteli Ing. Pavlu Jandovi, CSc., a konzultantu RNDr. Karlu Nesměrákovi, Ph.D. za odbornou pomoc a cenné rady. Rád bych také poděkoval RNDr. Zdeňku Bastlovi CSc., z Ústavu fyzikální chemie Jaroslava Heyrovského, AV ČR, za provedení XPS analýzy. Také bych chtěl poděkovat RNDr. Haně Tarábkové, Ph.D. z Ústavu fyzikální chemie Jaroslava Heyrovského v Praze a své rodině za podporu během studia.

Obsah

1 ÚVOD.....	8
2 TEORETICKÁ ČÁST	10
2.1 Použité elektrochemické metody	10
2.1.1 Cyklická voltametrie.....	10
2.1.2 Diferenční pulzní voltametrie	12
2.2 Možnosti zpracování dat	13
2.3. Směsný vzorek	15
2.3.1 Kávová kyselina.....	16
2.3.2 Askorbová kyselina.....	18
2.3.3 Gallová kyselina	19
2.4 Elektrodové materiály	20
2.4.1 Skelný uhlík a oxidovaný skelný uhlík.....	21
2.4.2 Vysoce orientovaný pyrolytický grafit	22
2.4.3 Zlato	22
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	24
3.1 Chemikálie	24
3.1.1 Spektrofotometrická měření	25
3.2 Elektrochemické metody	25
3.3 Elektrody.....	25
3.3.1 Příprava pracovních elektrod před měřením.....	26
3.4 Elektrochemická nádobka.....	27
3.5 Mikronádobka	27
3.6 Vyhodnocení dat	29

4 VÝSLEDKY A DISKUZE.....	31
4.1 Elektrochemické chování elektrod v základním elektrolytu.....	31
4.2 Kávová kyselina.....	35
4.3 Askorbová kyselina.....	43
4.4 Gallová kyselina	49
4.5 Zpracování dat	56
4.5.1 Normalizace na základní linii	56
4.5.2 Sloupcové grafy parametrů	60
4.5.3 Směsný analyt a matematická dekonvoluce jednotlivých komponent	62
4.5.4 Modelová voltametrická křivka směsného analytu.....	64
4.6 Porovnávání voltametrických dat pomocí korelačních funkcí	69
4.6.1 Modelové chování korelační funkce při definované vzájemné odchylce souborů dat.....	69
4.6.2 Korelační funkce experimentálních souborů voltametrických dat	72
4.6.2.1 Korelace experimentálních a matematickým sloučením vytvořených víc-komponentních voltamogramů směsných analytů.....	73
4.6.2.2 Korelace experimentálních a matematickou eliminací vytvořených voltametrických křivek jednotlivých analytů	75
5 ZÁVĚR.....	80
LITERATURA	83

Seznam použitých zkratk a symbolů

A	absorbance
AU	arbitrary units
AFM	mikroskopie atomárních sil (z angl. atomic force microscopy)
c	molární koncentrace [mol dm^{-3}]
E	potenciál [V]
$E_{p,A}$	píkový potenciál anodického píku [V]
$E_{p,K}$	píkový potenciál katodického píku [V]
GC	skelný uhlík (z angl. glassy carbon)
GCo _x	anodickou oxidací modifikovaný skelný uhlík
HOPG	vysoce orientovaný pyrolytický grafit (z angl. highly oriented pyrolytic graphite)
$I_{p,A}$	anodický proud píku [A]
$I_{p,K}$	katodický proud píku [A]
LOD	limit detekce (z angl. limit of detection)
SCE	nasycená kalomelová elektroda (z angl. saturated calomel electrode)
ν	rychlost vkládání potenciálu [V s^{-1}]
XPS	rentgenová fotoelektronová emisní analýza (z ang. x-ray photoelectron spectroscopy)

1 ÚVOD

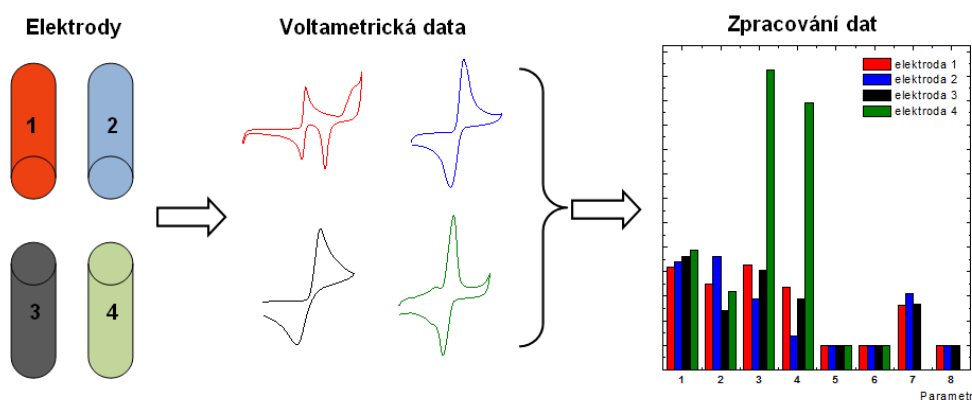
Cílem práce je prozkoumat ovlivnění selektivity elektrochemické analýzy použitím multielektrodového systému tvořeného elektrodami s nesespecifickou odezvou, s ohledem na možnost uplatnění při konstrukci senzorového pole typu „elektronický jazyk“ [1].

Práce je založena na principu známém jako slučování (kombinování) dat z více senzorů (z ang.: *Multisensor Data Fusion* [2]). Kombinování dat z více senzorů slouží k získání informace o zkoumaném objektu, která je ve výsledku úplnější, přesnější nebo spolehlivější než informace získaná z jediného senzoru. Umožňuje použití i senzorů s nízkou selektivitou uspořádaných do senzorových polí, kde se charakteristiky jednotlivých senzorů mohou překrývat. Sensory přitom mohou být různého typu – tj. mohou sbírat různé druhy informací, které v kombinaci poskytují celistvější charakteristiku daného objektu nebo procesu než jednotlivý senzor. Mimo to, kombinace informací z více senzorů snižuje i míru nejistoty ve srovnání s informací z jediného zdroje. Vzhledem k určité nadbytečnosti informace je dosaženo lepšího odstupu signál/šum, stability odezvy a minimalizuje pravděpodobnost výskytu chyby, apod. [4]. Přístup využívající kombinace většího počtu nesespecifických (a tedy nízko – nákladových) senzorů uspořádaných do pole senzorů, za účelem dosažení specifického chování skupiny, které předčí specifickou chování jejich individuálních prvků, byl studován nejčastěji u plynových senzorů na bázi TiO_2 [3]. Všechny živé organismy využívají slučování dat z více senzorů.

Protože selektivita elektrochemických metod je v určité míře omezená, nabízí se použití tohoto postupu i v elektrochemii [4, 9, 10]. Tato práce se zabývá jednodušší variantou slučování dat, kde data pocházejí z jediného druhu zdroje informace – voltametrie na pevné elektrodě. Je zde využívána skutečnost, že průběh elektrochemických reakcí je do určité míry ovlivňován materiálem elektrody. Elektrochemická data získaná na různých typech elektrod se tedy vzájemně poněkud liší. Jejich kombinací vznikne soubor, jenž je specifičtější vzhledem k danému analytu

než informace získaná z voltametrické křivky analytu na jediné elektrodě. Specifičnost odezvy pro daný analyt bude narůstat s počtem různých nesespecifických prvků elektrodového systému. Zpracováním dat z většího počtu elektrod s nesespecifickou odezvou lze tak ze souboru naměřených dat získat parametry, které jsou do značné míry charakteristické pro reakci určité látky (tzv. *fingerprint*) (obr. 1.1). Výhodou tohoto uspořádání je skutečnost, že data získaná ze všech senzorů jsou stejného typu, což umožňuje jejich jednodušší zpracování s minimem chemometrických operací, resp. jejich přímé slučování do datových souborů.

V této práci byla použita skupina neselektivních elektrod s nízkou specificitou odezvy, které jsou často používány jako detektory v separačních technikách [5, 6, 48], či pro stanovení celkové oxidační, popřípadě redukční aktivity všech komponent směsného analytu [7, 8].



Obr. 1.1 Schéma ilustrující sběr a postup zpracování dat. Elektrody (1 – 4) jsou tvořeny různými elektrodovými materiály, na kterých se získají odlišné soubory elektrochemických dat, které jsou následně zpracovány matematickými operacemi. Tímto způsobem je vytvořen soubor parametrů („fingerprint“) významně specifický pro daný analyt.

Složení modelové směsi analytů – kávová, askorbová a gallová kyselina – bylo zvoleno nejen z důvodu praktického využití analýzy těchto kyselin, které se vyskytují v řadě potravin, ale i s ohledem na zastoupení složek s rozdílným elektrochemickým chováním – reversibilitou, adsorpcí na elektrodách, vytvářením meziproduktů [11].

2 TEORETICKÁ ČÁST

Elektrochemické chování látek je ovlivněno jejich strukturou, resp. depozicí na povrchu elektrod, ale i povahou elektrodového materiálu, zda se jedná o kov či nekov, morfologií povrchu, či schopností na svém povrchu vytvářet aktivní skupiny, které mají vliv na probíhající elektrochemické děje [11].

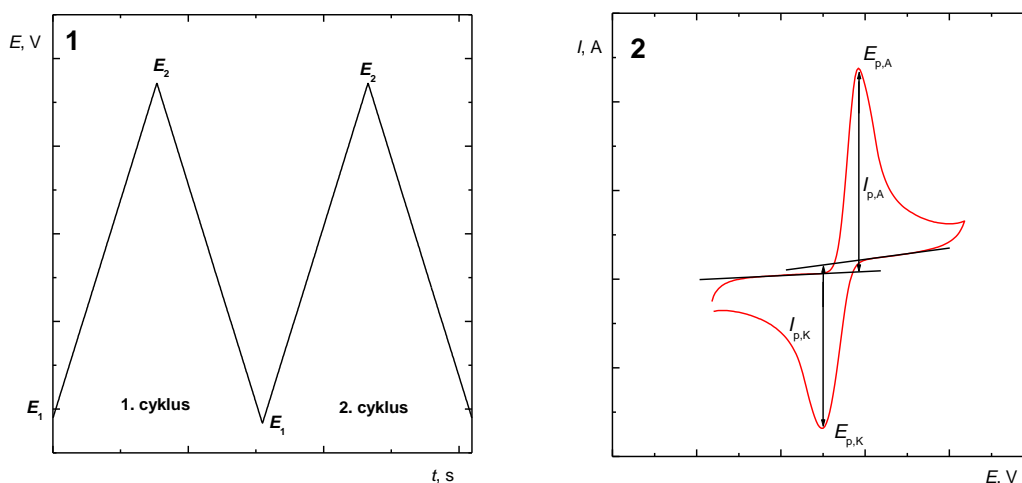
2.1 Použité elektrochemické metody

Elektrochemické metody jsou především využívány pro studium mechanismu elektrochemických dějů [17]. Rychlost, jednoduchost, a nízká cena analýz jsou jedny z předností elektrochemických metod [18, 19]. Dalšími přednostmi elektrochemických metod je citlivost, která je závislá především na použité elektrochemické metodě. S vývojem nových typů chemicky modifikovaných elektrod vzrostla postupně jejich selektivita [12, 13]. V závislosti na použité elektrochemické technice lze z analyzovaného roztoku získat řadu rozdílných informací [21].

2.1.1 Cyklická voltametrie

Cyklická voltametrie (CV) je jedna z elektrochemických metod, používaná pro získávání kvalitativních informací o elektrochemických reakcích. Z průběhu cyklických voltamogramů je možné usuzovat na mechanismus elektrochemických reakcí [14, 15, 17].

Na pracovní elektrodu je vkládán potenciál trojúhelníkového průběhu s různou rychlostí změny (tzv. rychlost polarizace) od zvoleného počátečního potenciálu E_1 přes konečný potenciál E_2 zpět do počátečního potenciálu E_1 (obr. 2.1 (1)) [14–16, 21].



Obr. 2.1 Potenciálový program cyklické voltametrie (1), příklad cyklického voltamogramu pro reversibilní systém (2).

Cyklickou voltametrii lze realizovat v dvoelektrodovém či třielektrodovém zapojení. Při použití dvoelektrodového zapojení není známa přesná hodnota potenciálu pracovní elektrody, jelikož při průchodu proudu dochází ke ztrátě části vložného napětí vlivem odporu měřeného roztoku. V praxi je proto běžnější třielektrodové zapojení. Při tomto zapojení je proud měřen mezi pracovní a pomocnou elektrodou a potenciál je vkládán mezi pracovní a referenční elektrodu [14, 22]. Odezvou cyklické voltametrie jsou tzv. cyklické voltamogramy, tedy závislost proudu protékajícího elektrodou na jejím potenciálu. Cyklický voltamogram je složitá, časově závislá funkce velkého počtu chemických a fyzikálních parametrů. Naměřené cyklické voltamogramy mají tvar píku, výška píků souvisí s rychlostí vkládání potenciálu a koncentrací látky přítomné v elektrochemické cele [14, 16, 22].

Cyklický voltamogram (obr. 2.1 (2)) poskytuje několik důležitých parametrů. Poloha píku na potenciálové ose udává kvalitu a proudová odezva píku udává kvantitu analytu [14, 15].

Při cyklické voltametrii se pracuje v nemíchaných roztocích, tedy transport látky k elektrodě je zajištěn pouze difúzí [15, 16].

Proudová odezva píků pro reverzibilní, difúzně řízené systémy je dána Randlesovou-Ševčíkovou (2.1) rovnicí (při 25°C) [cit. 14–16, 22]:

$$I_p = (2,69 \times 10^5) n^{3/2} A c D^{1/2} \nu^{1/2} \quad (2.1)$$

kde n je počet vyměňovaných elektronů, A je plocha elektrody [cm^2], c molární koncentrace [mol cm^{-3}], D difuzní koeficient [$\text{m}^2 \text{s}^{-1}$] a v je rychlost vkládání potenciálu [V s^{-1}].

V případě ireverzibilních a quazi-reverzibilních systémů lze proud v píku vypočítat dle rovnice (2.2) [cit. 14, 16].

$$I_p = (2,99 \times 10^5) n(\alpha n_a)^{1/2} A c D^{1/2} v^{1/2} \quad (2.2)$$

kde n je počet vyměňovaných elektronů, α koeficient přenosu náboje, n_a počet elektronů účastnících se přenosu náboje, A je plocha elektrody [cm^2], c molární koncentrace [mol cm^{-3}], D difuzní koeficient [$\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$] a v je rychlost vkládání potenciálu na elektrodu [V s^{-1}].

Pozice píků na potenciálové ose souvisí s formálním potenciálem redoxních procesů. Formální potenciál pro reverzibilní systém je lokalizován mezi $E_{p,A}$ a $E_{p,K}$ [cit. 14, 16, 22]:

$$E^f = \frac{E_{p,A} + E_{p,K}}{2} \quad (2.3)$$

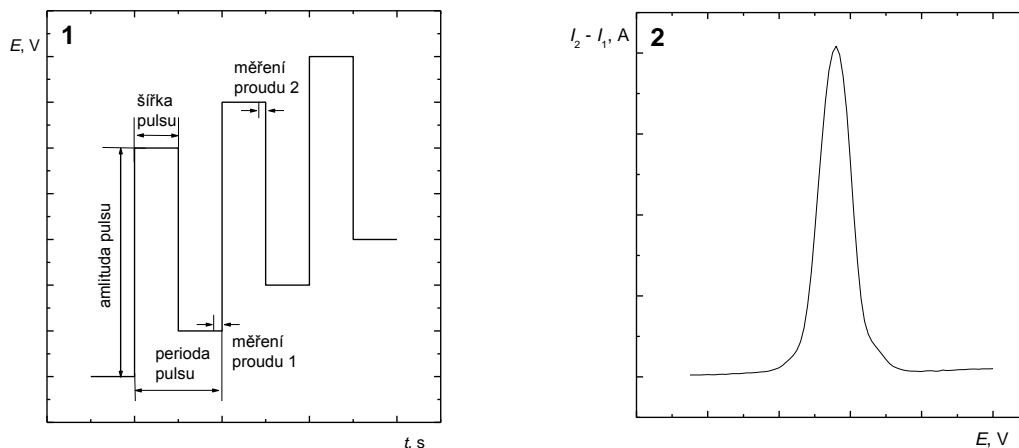
Rozdíl jednotlivých potenciálů píků (pro reverzibilní dvojici) je dán rovnicí 2.4 (při 25°C). Tohoto vztahu lze využít pro výpočet počtu přenesených elektronů během elektrodového děje [14, 16, 22].

$$\Delta E_p = E_{p,A} - E_{p,K} = \frac{0,059}{n} [\text{V}] \quad (2.4)$$

2.1.2 Diferenční pulzní voltametrie

Diferenční pulzní voltametrie (DPV) je užitečná technika pro analýzu stopových množství organických i anorganických látek. V diferenční pulzní voltametii jsou na lineárně měnící se potenciál pracovní elektrody vkládány napěťové pulsy o různé amplitudě (10 až 100 mV) trvající řádově desítky milisekund [14, 16, 22] (obr. 2.2 (1)). Registrace proudové odezvy probíhá těsně před vložením pulzu a na jeho konci. Rozdíl těchto registrovaných proudů $I_{DPV} = I_2(t_2) - I_1(t_1)$ se vynáší proti potenciálu. Výsledná závislost má tvar píku (obr. 2.2 (2)). Kvalita analytu je udána polohu píku na potenciálové ose, pro elektrochemicky reverzibilní systémy je potenciál píku blízký hodnotě $E_{1/2}$. [14, 16] Diferenční pulzní voltamogram, je tedy závislost

($I_{DPV} / \Delta E$) vs. E a lze ji považovat za obdobu derivace I / E křivky cyklického voltamogramu [20].



Obr. 2.2 Potenciálový program diferenční pulzní voltametrie (1) a vzorový diferenční pulzní voltamogram (2)

2.2 Možnosti zpracování dat

V této práci je využíváno skutečnosti, že elektrochemická data získaná na různých elektrodách s nespécifickou odezvou nejsou zcela totožná, dochází k jejich částečnému překrývání. Na odlišnosti elektrochemické odezvy daného analytu na různých elektrodách (obr. 1.1) se podílí jednak látka samotná, její molekulární struktura, interakce s rozpouštědlem (disociační konstanta apod.) a povrchem elektrody, ale také elektrodový materiál [11]. Soubor parametrů voltametrických křivek na jednotlivých elektrodách vykazuje tím vyšší specifitu vzhledem k danému analytu, čím větší počet neidentických dat jej tvoří. Analytová specifita tohoto souboru by měla narůstat s počtem kombinací položek v tomto souboru, tedy s $n!$, kde n je počet neidentických elektrod. Takto získaná data, resp. z nich odvozené parametry představují soubor s vyšším stupněm specifity pro danou látku na zvolných elektrodách, než data získaná na jediné elektrodě.

Z voltametrických píků lze získat následující parametry [25]:

- Pozice píku: potenciál, v kterém je hodnota proudu vzhledem k základní linii maximální, E_p [V], používá se také termín potenciál píku.
- Výška píku (I_p [A]): maximální hodnota proudu (intenzita) vzhledem k základní linii. Je dána koncentrací analytu, plochou elektrody a dalšími parametry jako

jsou difuzní koeficient analytu, rychlost vkládání potenciálu a počet vyměňovaných elektronů.

- Šířka v polovině píku ($E_p - E_{p/2}$ [V]): Rozdíl mezi potenciálem píku a potenciálem v polovině výšky píku.
- Plocha píku: plocha píku korigovaná k základní linii, vhodná v případě metod, kde naměřeným signálem je pík (DPV), v cyklické voltametii se využívá nejčastěji pro hodnocení kvantity povrchové reakce, neboť má význam náboje.
- Další parametry: v případě DPV amplituda pulzu či doba pulzu [25].

V běžných analýzách směsi analytů je použití elektrochemických technik limitováno jejich nedostatečnou selektivitou. To je způsobeno tím, že řada látek podléhá oxidaci či redukci při velmi blízkých potenciálech a tím dochází k překrýváním signálů [12, 13, 25]. Problém překrývajících se signálů je možné řešit chemickými, instrumentálními nebo stejně tak dobře i matematickými postupy. Použitím vhodné fyzikálně–chemické metody lze docílit rozdělení dvou či více analytů s podobnou odezvou [13, 27]. Patří sem metody separační, spektrometrické či metody založené na komplexaci. Další možností je změna experimentálních podmínek, jako je úprava pH či volba vhodného základního elektrolytu [25–27], popřípadě využití modifikovaných elektrod [13]. Ve výše zmíněných případech jsou překrývající se signály méně časté [25, 26]. Chemické a instrumentální metody a postupy jsou často využívány pro zvýšení selektivity, ale ne vždy vedou k požadovanému výsledku [13, 27].

Chemometrie, jakožto matematický postup nabízí alternativní řešení problému překrývajících se signálů [25, 26]. Matematické operace umožňují zvýšení rozlišení a často poskytují přesnější výsledky [13]. Chemometrický přístup s překrývajícími se signály je obvykle používán pro zpracování spektroskopických dat, jako jsou data UV-VIS spektrofotometrie, cirkulárního dichroismu, fluorometrie, infračervené a Rammanovy spektroskopie, NMR [25, 26].

Jednoduší a častěji používaná metoda pro simultánní vyhodnocení překrývajících se signálů (nezávislá na typu signálu) je dekonvoluce [13, 23, 25]. Jedním z předpokladů pro provedení dekonvoluce voltametrické křivky je, že křivka je tvořena diskrétními stejně vzdálenými body [29]. Dekonvoluce elektrochemických signálů umožňuje rozlišit odezvy (píky) energeticky shodných elektrochemických reakcí [29, 30], s možností následné jednoduché kalibrace za použití výšky či plochy

píku [23]. Použití dekonvoluce je běžnější při zpracování spekter, v elektrochemii je používána okrajově [23, 28, 29].

V elektrochemii jsou známy úspěšné aplikace vícerozměrné kalibrace založené na rozdílných regresních metodách. Těmito metodami jsou multilineární regrese (MLR), analýza hlavních komponent (PCA), metoda nejmenších čtverců a umělé neuronové sítě (ANN) [25]. Běžně jsou tyto matematické metody aplikované pro rozlišení nitrofenolů, chlorfenolů a kresolů, stanovených spektrofotometrickými a chromatografickými technikami [26]. Tyto metody jsou zřídka používány pro zpracování voltametrických dat [28, 29]. I když literatura uvádí použití multilineární regrese použité při stanovení stopového množství thalia a olova anodickou rozpouštěcí voltametrií, či při stanovení mědi, kadmia a niklu ve směsi diferenční pulzní polarografií [28].

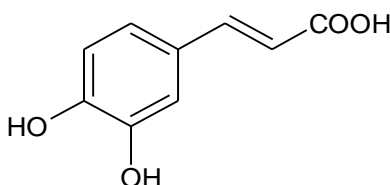
Úplně jiný přístup pro kvantifikaci a kalibraci analytů je založen na využití umělých neuronových sítí (ANN) [23]. V analytické chemii je velký zájem o využití ANN, jelikož se jedná o pokročilé způsoby zpracování signálu umožňující interpretovat, modelovat a kalibrovat složité analytické signály, schopné vytvářet modely lineárních i nelineárních systémů [24]. Výhodou umělých neuronových sítí je jejich schopnost vytvářet široké spektrum různých modelů stejného systému bez omezení linearity kalibrační funkce. Proto bývají aplikovány pro kvantitativní analýzu rozdílných multikomponentních systémů s komplexními vztahy [23].

2.3. Směsný vzorek

Jako modelový analyt byla použita ekvimolární směs tříkomponentního vzorku složeného z organických kyselin, jež se vyskytují často v potravinách. Použitými organickými kyselinami byly kávová, askorbová a gallová v 10% ethanolickém roztoku fosfátového pufru o $\text{pH} = 4,00$. Volba fosforečnanu byla ovlivněna snahou o maximální inertnost tlumivého roztoku a tedy minimální interakce s analytem. Směsný tříkomponentní analyt simuluje modelový potravinový vzorek.

2.3.1 Kávová kyselina

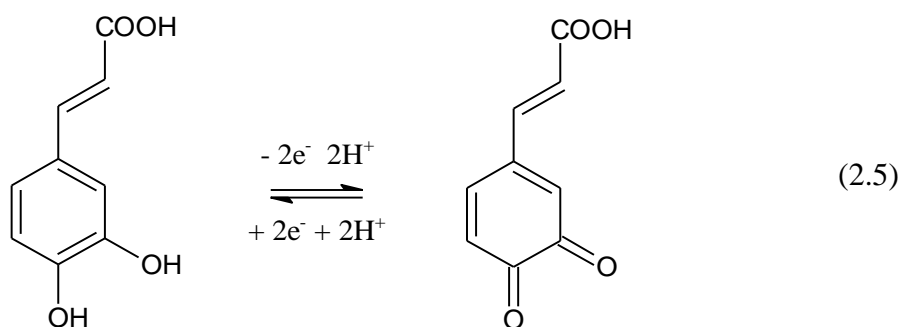
Kávová kyselina (3,4-dihydroxyskořicová) (obr. 2.3) patří do skupiny fenolických kyselin, přesněji mezi deriváty skořicové kyseliny [31, 32]. Kávová kyselina, či její deriváty jako jsou glykosidy, amidy, estery jsou v přírodě široce rozšířené chemické látky nacházející se v ovoci, zelenině, víně, olivovém oleji, obilninách, kávě a v řadě léčivých rostlin [31–33]. Nalézt ji můžeme i v tradičních čínských bylinkách (šalvěj červenokořená) [17]. Používá se také jako složka potravinových doplňků ve formě jednoduchých esterů s cukry nebo chinovou kyselinou. Kávová kyselina se považuje za důležitou součást obranného mechanismu rostlin vůči infekcím [18].



Obr. 2.3 Strukturní vzorec kávové kyseliny

Kávová kyselina vykazuje široké spektrum fyziologických a farmakologických vlastností. Byly prokázány její antioxidační, antimutagenní a antikarcinogenní účinky [18, 31]. Rovněž byly prokázány její protizánětlivé účinky a také ochranná funkce před kardiovaskulárními onemocněními [38].

Elektrochemická oxidace kávové kyseliny zahrnuje pouze jeden krok, při kterém dochází k přenosu dvou protonů a elektronů (2.5). Uvedená reakce 2.1 znázorňuje pouze celkový elektrodový děj [19, 34–36].



Oxidace kávové kyseliny probíhá přes nestabilní meziproducty za vzniku 3,4-dioxoskořicové kyseliny, která je redukována zpět na kávovou kyselinu při zpětném cyklu, jak je uvedeno v pracích [19, 34–36]. Kávová kyselina na elektrodě ze skelného uhlíku ($0,2 \text{ mol dm}^{-3}$ acetátový o $\text{pH} = 5$ ve směsi s acetonitrilem 90/10 (v/v)) vykazuje dobře definovaný oxidační voltametrický pík $E_{p,A} = 0,47 \text{ V vs. Ag/AgCl}$, odpovídající vzniku derivátu *o*-benzochinonu, který je zpětně redukován při zpětném cyklu při $E_{p,K} = 0,27 \text{ V vs. Ag/AgCl}$ jak uvádí Zeng a kol. [39]. Jedna oxidační vlna kávové kyseliny zahrnuje přenos dvou elektronů a vznik odpovídajícího oxidačního produktu (*o*-benzochinon) [39].

Ve vodných roztocích o $\text{pH} \leq 5,5$ probíhá oxidace kyseliny kávové reverzibilně [34]. Reverzibilita elektrochemické oxidace na elektrodě ze skelného uhlíku klesá s rostoucí rychlostí vkládání potenciálu. Proudová odezva $I_{p,A}$ roste lineárně s druhou odmocninou rychlosti vkládání potenciálu, jak uvádí Giacomelli a kol. [34] což značí, že se jedná o difúzně řízený děj [19, 34].

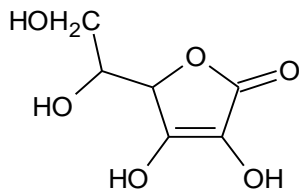
Použitím zlaté elektrody, na které byla před měřením elektrochemicky vytvořena vrstva zlatých oxidů cyklováním v potenciálovém rozsahu $-0,61 \text{ V}$ až $+1,19 \text{ V}$ rychlostí polarizace elektrody 300 V min^{-1} , vykazuje kávová kyselina dva anodické píky ($0,125 \text{ V}$ a $0,175 \text{ V vs. MSE}$) jak uvádí Trabelsi a kol. [36]. Anodické píky odpovídají oxidaci volné a adsorbované kávové kyseliny. Při zpětném cyklu je přítomen pouze jeden redukční pík $E_{p,K} = 0,100 \text{ V vs. MSE}$ [36].

Kávová kyselina bývá často využita pro elektrodpozici na povrch elektrod ze skelného uhlíku, čímž lze získat stabilní aktivní redox film, umožňující stanovení řady organických látek (askorbová kyselina), jednak samotné kávové kyseliny tak i hydrazinu, NADH či epinefrinu. Tyto látky mohou zabraňovat interakci karboxylových a hydroxylových skupin kávové kyseliny s povrchem elektrody [35, 57]. Vytvoření filmu kávové kyseliny na povrchu elektrody ze skelného uhlíku, umožnilo selektivní detekci kávové kyseliny ve směsi s jinými látkami [35, 37].

Pro studium elektrochemického chování a stanovení kávové kyseliny v různých maticích byla použita řada různých elektrod včetně modifikovaných [18, 19, 37]. V literatuře nejsou dostupné články o stanovení či elektrochemickém chování kávové kyseliny na HOPG či anodickou oxidací modifikovaném GC.

2.3.2 Askorbová kyselina

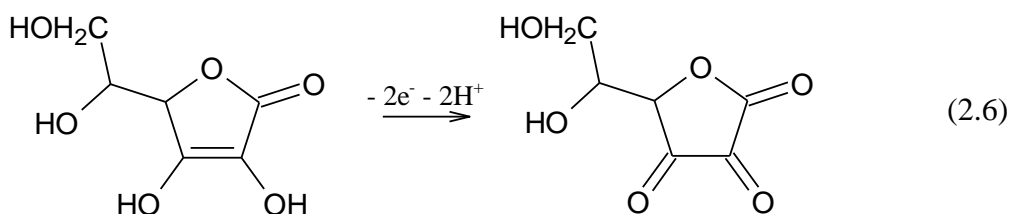
Askorbová kyselina (obr. 2.4) je ve vodě rozpustná organická kyselina, která je všeobecně známá jako vitamin C. V přírodě se jedná o běžně se vyskytující látku v ovoci a zelenině [40]. Bohatými zdroji vitamínu C jsou především citrusové plody, červené a zelené papriky, černý rybíz, rajčata a listová zelenina [41].



Obr. 2.4 Strukturní vzorec askorbové kyseliny

Vitamin C je rozšířeným konzervačním činidlem, se kterým se můžeme setkat v komerčně dostupných produktech, jako jsou ovocné džusy, džemy a dokonce mléčné výrobky [43]. V organismu hraje vitamin C nezanedbatelnou úlohu při utváření pojivových tkání, kostí, zubů a krevních cév a napomáhá také absorpci železa [41, 44].

Při elektrochemické ireverzibilní anodické oxidaci askorbové kyseliny dochází ke ztrátě dvou elektronů a protonů za vzniku dehydroaskorbové kyseliny podle reakce 2.6 [cit. 42, 44, 47].

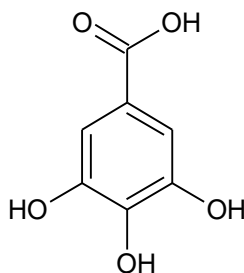


Elektrochemická oxidace askorbové kyseliny na elektrodě je difúzně řízený děj jak dokládá Kilic a kol. [44] jak ukazuje závislost $I_{p,A}$ na $v^{1/2}$. Ireverzibilní průběh elektrochemické oxidace askorbové kyseliny na elektrodových materiálech dokládá i dostupná literatura [41, 42, 44, 45, 47]. Askorbová kyselina byla studována metodou cyklické voltametrie na řadě elektrodových materiálů. Mezi tyto elektrodové materiály patří Pt, Ni a Pt-Ni elektrody [41, 45], uhlíková pastová elektroda [41], zlatá elektroda ($E_{p,a} = 0,360$ V vs. SCE, $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ fosfátový pufr, pH = 5,00) [46]. Dále pak na GC ($E_{p,A} = 0,45 - 0,60$ V vs. Ag/AgCl) [cit. 7, 9, 12] a GCox elektrodě ($E_{p,A} = 0,270$ V vs. Ag/AgCl) [cit. 42, 44, 47], popřípadě jsou výše uvedené elektrody používány jako

základ pro modifikované elektrody. V dostupné literatuře nebylo popsáno stanovení askorbové kyseliny na HOPG.

2.3.3 Gallová kyselina

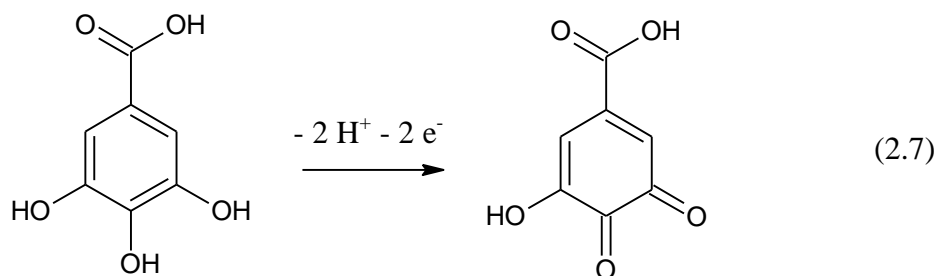
Gallová kyselina (3,4-trihydroxy benzoová kyselina) (obr. 2.5) a její deriváty patří do skupiny přírodních polyfenolických antioxidantů, které mají pozitivní účinky na lidské zdraví [8]. V přírodě je hojně zastoupena v čaji, hroznovém víně, jeřabinách a v mnohém dalším ovoci tak jako i ve víně [50, 53].



Obr. 2.5 Strukturní vzorec gallové kyseliny

Kyselina samotná i její deriváty vykazuje široké spektrum biologických účinků, mezi které patří antioxidační, protizánětlivé, antimikrobiální, antikarcinogenní [8, 48, 50] a antimutagenní účinky [49]. Gallová kyselina je používána při výrobě potravin, kosmetiky a potravinářských obalových materiálů jako prevence proti žluknutí tuků a kažení výrobků [49]. Gallová kyselina i její estery jsou používány jako antioxidanty v potravinářském i farmaceutickém průmyslu (E310 – propyl gallát, E311 oktyl gallát).

Elektrochemická oxidace gallové kyseliny na elektrodě ze skleného uhlíku publikovaná v práci [8] probíhá složitým mechanismem přes radikálové meziprodukty. Celkovou ireverzibilní elektrochemickou oxidaci gallové kyseliny popisuje rovnice 2.7 [8, 52].



Hamid a kol. [8] popisuje elektrochemické chování gallové kyseliny na elektrodě ze skelného uhlíku ve fosfátovém pufru. V rozsahu $\text{pH} = 1,6 - 6,2$ při použití cyklické voltametrie poskytuje gallová kyselina dva ireverzibilní, difúzně řízené anodické píky [8, 53]. Potenciál těchto píků se posouvá k méně pozitivním hodnotám se vzrůstajícím pH roztoku [8]. Potenciál jednotlivých anodických píků lze vypočítat podle následujících vztahů (rov. 2.8 a 2.9), publikovaných Hamidem a kol. [8]. Uvedené rovnice jsou v dobré shodě s teoretickým Nernstovským systémem zahrnujícím přenos jednoho elektronu následovaným jednoduchou deprotonizací.

$$E_{p1} = 682,9 - 47,5 \text{ pH pro 1. pík (vs. SCE)} \quad (2.8)$$

$$E_{p2} = 991,2 - 50,1 \text{ pH pro 2. pík (vs. SCE)} \quad (2.9)$$

Yang a kol. [52] popisuje přítomnost pouze jednoho anodického píku ($E_{p,A} = 0,329 \text{ V vs. SCE}$) na cyklickém voltamogramu naměřeném na elektrodě ze skelného uhlíku v acetátovém pufru o $\text{pH} = 4,5$. Z dostupné literatury je možno zjistit, že pro stanovení gallové kyseliny jsou především využívány chromatografické techniky. Gallová kyselina a její elektrochemické chování bylo studováno především na elektrodě ze skelného uhlíku [8, 52, 54]. Použití elektrodových materiálů jako zlato, HOPG či anodickou oxidací modifikovaný skelný uhlík nebylo pro studium elektrochemického chování gallové kyseliny v dostupné literatuře nalezeno. Stejně tak jako v případě kávové kyseliny lze využít gallovou kyselinu pro depozici na povrch elektrody, čímž je získán elektroaktivní polymer vhodný např. pro stanovení dopaminu v různých matricích [75].

2.4 Elektrodové materiály

V této práci je soustava elektrod zjednodušena na čtyři chemicky odlišné pracovní elektrody s nízkou specifičností odezvy, bez modifikace povrchu specificky reagujícím mediátorem: GC, GCox, HOPG, Au. Elektrody byly voleny s ohledem na možnost regenerace *in situ*, bez nutnosti použití složitých technik a depozice mediátoru. Důležitým faktorem při používání pevných elektrod je jejich závislost odezvy (ve smyslu aktivity, stability a reprodukovatelnosti) na stavu elektrodového povrchu. K získání správných výsledků je proto nutné dodržet definované postupy předúpravy

elektrodového povrchu [66]. Adsorbované nečistoty na elektrodovém povrchu mohou inhibovat některé elektrochemické procesy [69].

2.4.1 Skelný uhlík a oxidovaný skelný uhlík

Skelný uhlík je jedním z nejběžnějších uhlíkových materiálů využívaných v elektrochemii. Je tvořen částečně amorfním uhlíkem s grafitickými pentlicemi [61, 64]. Charakteristickými vlastnostmi skelného uhlíku, jako elektrodového materiálu, jsou široký potenciálový rozsah, nepropustnost pro plyny a kapaliny [56, 61, 65], a poměrně nízká elektrická a tepelná vodivost [65]. V neposlední řadě také jednoduchost, se kterou může být modifikován jeho povrch [56]. Běžně se pro úpravu povrchu skelného uhlíku používá leštění abrazivními materiály jako je alumina či diamantové pasty. Zde dochází většinou k problémům (např. s nízkou reprodukovatelností), které jsou vesměs způsobeny leštěním, a proto bylo navrženo mnoho způsobů úpravy elektrod před měřením [55, 61].

Povrch elektrody ze skleného uhlíku je možno modifikovat různými způsoby, jako je aktivace laserem, vodíkovou plazmou, elektrochemickou polarizací [61]. Široce používanou metodou pro modifikaci povrchu GC, především ke zlepšení aktivity elektrody, je elektrochemická aktivace elektrody prostřednictvím oxidace či redukce povrchu [57, 58, 61]. Použití této metody, jak uvádí mnoho autorů, slouží k překonání pomalé kinetiky mnohých elektrodových procesů [56, 59] a také jako prostředek ke snížení přepětí [59]. Elektrochemická úprava zahrnuje anodickou oxidaci povrchu elektrody při hodnotě potenciálu kolem 1,8 V vs. SCE, která bývá často následována katodickou redukcí [56]. Jinou možností je cyklování v potenciálovém rozsahu – 1,0 až 1,5 V vs. SCE, v 0,1 mol dm⁻³ fosfátovém pufru (pH = 2,0), či v kyselině chloristé o koncentraci 0,1 mol dm⁻³ [64]. Na povrchu elektrody se vytvářejí specifické funkční skupiny s katalytickou aktivitou. Předpokládá se, že elektrochemickou oxidací povrchu elektrody jsou vytvářeny funkční skupiny obsahující kyslík, jako jsou hydroxylové, karbonylové a karboxylové skupiny, které jsou zodpovědné za zvýšení účinnosti aktivovaných uhlíkových elektrod [59].

2.4.2 Vysoce orientovaný pyrolytický grafit

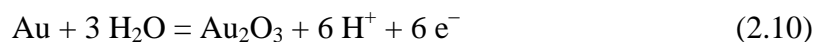
Vysoce uspořádaný pyrolytický grafit patří mezi poměrně inertní materiály [62]. Bazální rovina vysoce uspořádaného pyrolytického grafitu (HOPG), tvořená plochami vícevrstvého grafenu – představuje prakticky monokrystalický inertní povrch s minimální katalytickou aktivitou [61], která se navíc projevuje pouze na poruchách krystalové plochy, jejichž povrchová koncentrace je (vzhledem k tomu, že jde o materiál vyráběný pro rentgenovou optiku) výrobním postupem minimalizována [76]. Z důvodu dobře definovaných strukturních vlastností bývá v elektrochemii využíván jako elektrodový materiál [62]. Každý uhlíkový atom je spojen se třemi ostatními atomy ve stejné rovině. Zbytkové proudy pro HOPG, bez větších defektů bazální roviny, jsou obvykle nízké s hodnotami pod $5 \mu\text{A cm}^{-2}$ v rámci potenciálového okna [61]. Využití HOPG jako elektrodového materiálu předurčuje i snadná obnovitelnost jeho povrchu (standardizace) sloupnutím adhezivní páskou [61, 63].

2.4.3 Zlato

Polykrystalické zlato představuje metalickou elektrodu s povrchovými metal-oxidickými a suboxidickými sloučeninami [71]. Katalytická aktivita této elektrody je ve srovnání s HOPG vyšší a projevuje se v reakcích, jichž se účastní metalické oxidy, resp. jež jsou těmito oxidy blokovány (včetně adsorpce analytu, meziproductů a finálních produktů). Je využíváno v metodách a postupech katalýzy, přenosu elektronů a při studiu povrchových jevů, které vyžadují stabilní a reprodukovatelný povrch jako je STM (scanning tunneling microscopy), voltametrie, amperometrie či elektrochemická impedanční spektroskopie [66]. Jednou z hlavních výhod zlata je značná odolnost vůči korozi, snadná elektrodepozice na povrchu různých materiálů, což ho předurčuje k využití v moderních technologiích, především v elektronických systémech [67].

V literatuře je popsána řada mechanických, tepelných, chemických a elektrochemických přípravných postupů [66, 67]. Mechanická úprava povrchu zahrnuje leštění povrchu brusnými prostředky, jako jsou brusné papíry či diamantové pasty [70, 72]. Jednou z možností elektrochemické úpravy je cyklování elektrody v $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ kyselině sírové mezi potenciály, při kterých dochází k oxidaci a redukci povrchu zlaté elektrody. Tento postup je velmi efektivní pro odstranění adsorbovaných

nečistot na povrchu [66, 69, 72]. Kromě odstranění nečistot dochází také k tvorbě hydrofilní vrstvy zlatých oxidů (2.10) [69, 71].



Při potenciálu 1,457 V (vs. RHE – reverzibilní vodíková elektroda) je produktem hydratovaný oxid (zastoupený jako $\text{Au}(\text{OH})_3$ nebo $\text{Au}_2\text{O}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) nebo při potenciálu 1,511 V (vs. RHE – reverzibilní vodíková elektroda), kdy vzniká bezvodý oxid [71]. Vrstva těchto oxidů na povrchu elektrody může ovlivňovat rychlost přenosu elektronů, tedy kinetiku reakce [68] a mechanismus mnoha reakcí [61].

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Chemikálie

Studované látky použité v této práci byly askorbová kyselina Ph.Eur.3 (Lachema), kávová kyselina $\geq 98,0\%$ HPLC (Sigma Aldrich) a gallová kyselina (monohydrát) p.a. (Lachema).

Dále používanými chemikáliemi v této práci byly 85% kyselina fosforečná p.a. (Lach–Ner), ethyl alkohol 96% Ph.Eur.6 (Lach–Ner), dihydrogenfosforečnan sodný p.a. (Lach–Ner), 96% kyselina sírová p.a. (Lach–Ner), argon 4.8 (Linde).

Základním elektrolytem byl 10% ethanolický roztok $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ dihydrogenfosforečnanu sodného o $\text{pH} = 4,00$ (upravováno za potenciometrické kontroly $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ kyselinou fosforečnou). Rozpuštěním odváženého množství kyselin v základním elektrolytu byly připraveny zásobní roztoky kyselin o koncentraci $5 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$. Kávová kyselina byla rozpouštěna za zvýšené teploty na vodní lázni, z důvodu nízké rozpustnosti za laboratorní teploty. Zásobní roztok askorbové kyseliny byl připravován před každým měřením čerstvý z důvodu nízké stability, jak dokládá spektrofotometrické měření. Roztoky kávové a gallové kyseliny byly připravovány každý den čerstvé z důvodu stability ověřené spektrofotometrickým měřením.

Pro měření pH byl použit pH – metr Jenway typu 3510 s kombinovanou skleněnou elektrodou, kalibrovanou na standardní pufrů ($\text{pH} = 4, 7, 10$) před každým měřením. Destilovaná voda byla připravena systém Rowapur (Watrex) a Milli-Q system Gradient, Milipore, $R = 18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$.

3.1.1 Spektrofotometrická měření

Stabilita roztoků jednotlivých analytů byla stanovena spektrofotometricky. Pro měření spekter byl použit spektrofotometr značky Hewlett Packard 8453 řízený počítačovým softwarem UV-Visible ChemStations.

3.2 Elektrochemické metody

Elektrochemickými metodami využitými v této práci byly cyklická voltametrie a diferenční pulzní voltametrie v tříelektrodovém uspořádání na elektrodách z pevných materiálů.

3.3 Elektrody

Byly použity čtyři druhy pracovních elektrod:

1. Metalická elektroda s povrchovými oxidy a suboxidy: Zlatá elektroda (Au) o ploše $3,14 \text{ mm}^2$ ukotvená v teflonovém pouzdru, která byla vyrobena na Ústavu fyzikální chemie Jaroslava Heyrovského v Praze.
2. Semimetalická elektroda s katalyticky inaktivním povrchem, často používaná jako inertní nosič katalyticky aktivního materiálu: Bazální rovina vysoce orientovaného pyrolytického grafitu (dále HOPG) $12 \times 12 \times 2 \text{ mm}$ (HOPG ZYB Grade, Bruker).
3. Uhlíková: Skelný uhlík (GC) tvořená amorfním uhlíkem s kolísajícím obsahem grafitických pentlic, bez chemické úpravy povrchu (plocha $12,57 \text{ mm}^2$) od firmy SPI Supplies.
4. Uhlíková: Skelný uhlík s anodickou oxidací vytvořenou vrstvou oxidických skupin (viz analýza XPS) – katalyticky aktivní (GCox), (plocha $12,57 \text{ mm}^2$) od firmy SPI Supplies.

Referenční elektrodou byla saturovaná kalomelová elektroda (SCE) od firmy Theta'90 (typu RE403) a SCE mikroelektroda vyrobená v Ústavu fyzikální chemie Jaroslava Heyrovského v Praze. Pomocnou elektrodou byl platinový drátek.

Veškerá elektrochemická měření byla realizována na potenciostatu / galvanostatu typu PalmSens (Palm Instruments BV), řízeného počítačovým softwarem PSTrace v. 1.4.

Nanomorfologie povrchu elektrod byla sledována mikroskopií atomárních sil při laboratorní teplotě, NanoScope IIIa Multimode (Digital Instruments).

Charakterizace chemického složení povrchu elektrody ze skleného uhlíku po anodické oxidaci byla provedena metodou XPS Gammapdata Scienta, Sweden).

3.3.1 Příprava pracovních elektrod před měřením

Zlatá pracovní elektroda byla před každým měřením leštěna diamantovou pastou WINTER diaplast s velikostí částic D 0,25 (Ernst Winter & Sohn, Německo) nanesenou na bezvláknové buničině Kimwipes (Kimberly-Clark Worldwide, USA). Po leštění byla elektroda důkladně opláchnuta destilovanou vodou, osušena bezvláknovou buničinou Kimwipes. Na elektrodu umístěnou v nádobce se základním elektrolytem byly vkládány 100 ms potenciálové pulzy $E_1 = -0,8$ V; $E_2 = 0,0$ V a $E_3 = +1,6$ V (vs. SCE) [69] metodou multi pulzní amperometrie po dobu 500 sekund. Tímto způsobem bylo dosaženo reprodukovatelného povrchu zlaté elektrody.

Pro přípravu elektrody z HOPG bylo využito lepicí pásky (Scotch Tape), kterou byla sloupnuta bazální rovina HOPG a připevněna na ocelový terčík o průměru 15 mm pomocí oboustranné lepicí pásky (Scotch Tape). Elektrický kontakt bazální roviny HOPG byl zajištěn mosazným plíškem umístěným na okraji HOPG elektrody.

Elektroda z GC materiálu byla leštěna před každým měřením diamantovou pastou WINTER diaplast s velikostí částic D3 SS (Ernst Winter & Sohn, Německo) nanesenou na bezvláknové buničině Kimwipes (Kimberly-Clark Worldwide, USA). Poté byla GC elektroda důkladně opláchnuta destilovanou vodou a osušena bezvláknovou buničinou Kimwipes.

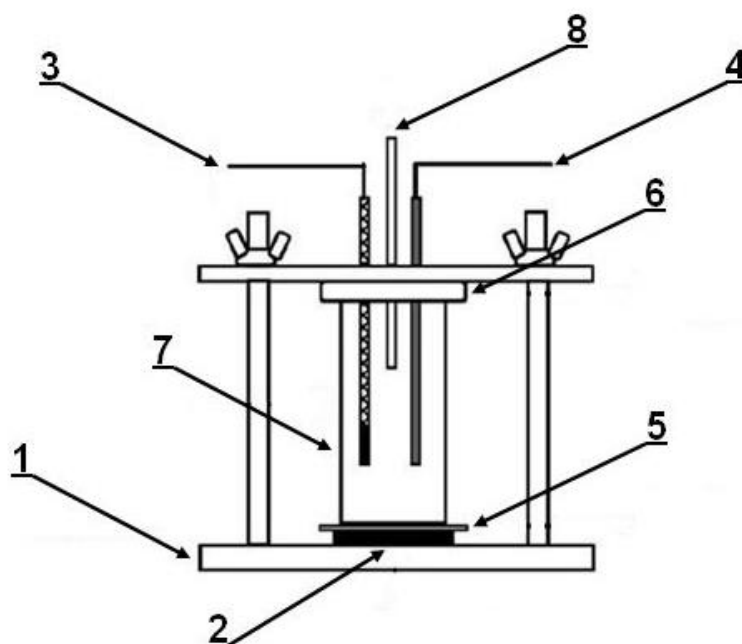
Prvním krokem při přípravě GCox bylo leštění jejího povrchu před každým měřením diamantovou pastou WINTER diaplast s velikostí částic D3 SS (Ernst Winter & Sohn, Německo) nanesené na bezvláknové buničině Kimwipes (Kimberly-Clark Worldwide, USA). Poté byla GCox elektroda důkladně opláchnuta destilovanou vodou a osušena bezvláknovou buničinou Kimwipes. Následně byl povrch elektrody elektrochemicky oxidován v $0,50 \text{ mol dm}^{-3}$ kyselině sírové při potenciálu 2,0 V proti SCE po dobu 50 sekund. Poté byla elektroda před dalším použitím opláchnuta destilovanou vodou a roztokem základního elektrolytu.

3.4 Elektrochemická nádobka

Pro měření na zlaté elektrodě bylo použito klasické elektrochemické nádobky o objemu 50 ml. Do plastové hlavice ukotvující elektrochemickou nádobku byla vložena pracovní zlatá elektroda, referenční saturovaná kalomelová elektroda (SCE) od firmy Theta'90 (typu RE403), platinová pomocná elektroda a dvojcestný kohout umožňující přívod argonu pod a nad hladinu analyzovaného roztoku. Do elektrochemické nádobky bylo pipetováno vždy 10,00 ml základního elektrolytu. K odstranění kyslíku byl do roztoku v elektrochemické nádobce před každým měřením zaváděn argon po dobu 10 minut, během měření byl argon zaváděn nad hladinu roztoku.

3.5 Mikronádobka

Pro měření na elektrodách z HOPG, GC a GCox byla použita mikroelektrochemická nádobka (obr. 3.1) navržená Ing. Pavlem Jandou a Mgr. Věrou Mansfeldovou a zkonstruovaná v Ústavu fyzikální chemie Jaroslava Heyrovského v Praze [73]. Mikroelektrochemická nádobka je tvořena skleněným válcem s výškou 38 mm, tloušťkou stěny 1,5 mm a vnitřním průměrem 7 mm. Cěla je uzavřena teflonovým víčkem se třemi otvory o průměru 2 mm pro vložení referenční kalomelové mikroelektrody (SCE), pomocné platinové elektrody a skleněné trubičky pro přívod argonu. Dno cely je tvořeno pracovní elektrodou, na které je uloženo těsnění Viton (fluoropolymer) s centrálním otvorem o průměru 4 mm. Cěla je sevřena mosazným svěrákem sloužícím zároveň jako kontakt pracovní elektrody.



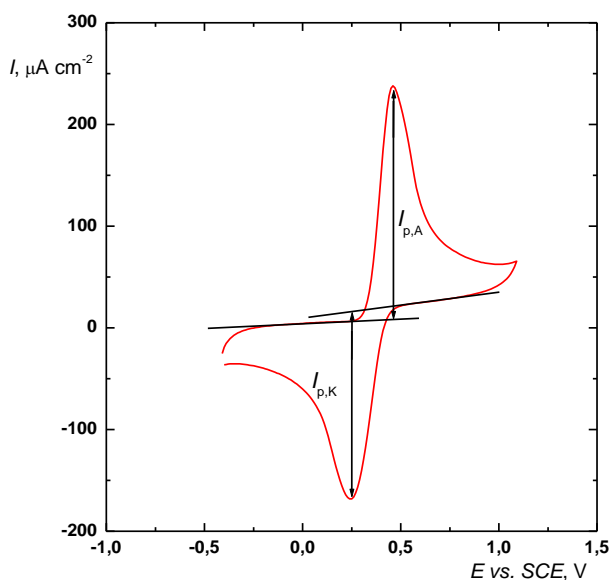
Obr. 3.1 Použitá mikroelektrochemická cela pro měření s HOPG, GC a GCox elektrodou, kde (1) je mosazný svěrák, (2) pracovní elektroda, (3), referenční SCE mikroelektroda, (4) pomocná platinová elektroda, (5) těsnění z pryže Viton, (6) teflonové víčko, (7) skleněný válec, (8) přívod argonu [převzato ze 76].

Pro měření kalibračních závislostí byly připraveny kalibrační roztoky do odměrných baněk, jako rozpouštědlo byl použit základní elektrolyt. Kyslík přítomný v základním elektrolytu a kalibračních roztocích byl před každým měřením odstraněn zaváděním argonu do roztoku po dobu 10 minut a během měření byl argon zaváděn nad hladinu. Pro měření prvního bodu kalibrační závislosti byl do cely Pasteurovou pipetou napipetován 1,00 ml kalibračního roztoku o nejnižší koncentraci. Po změření tohoto kalibračního bodu, byl roztok z mikroelektrochemické nádoby odstraněn pomocí pipety, nádoba byla dvakrát propláchnuta následujícím kalibračním roztokem o vyšší koncentraci. Poté byl do elektrochemické cely napipetován 1,00 ml zásobního roztoku o této koncentraci a bylo provedeno měření.

3.6 Vyhodnocení dat

Pro vyhodnocení naměřených dat bylo použito programu Origin, verze 6.1. Dalšími programy použitými pro vyhodnocení a zpracování dat byl Microsoft Office Excel a Word 2007. Naměřená data byla statisticky zpracována na hladině významnosti $\alpha = 0,05$. Kalibrační závislosti byly vyhodnoceny metodou lineární regrese.

Pro odečet potenciálu E_p a proudové hodnoty I_p byly použity vždy první cykly naměřených cyklických voltamogramů. Výška píku I_p , byla vztahována k základní linii, za kterou byla zvolena náběžná hrana píku, jak je zobrazeno na obr. 3.2.



Obr. 3.2 Způsob odečtení $I_{p,A}$ a $I_{p,K}$ použitý u všech naměřených cyklických voltamogramů.

Pro kávoovou, askorbovou a gallovou kyselinu byly vypočteny limity detekce na jednotlivých elektrodoích materiálech podle výrazu:

$$\text{LOD} = \frac{3 \times s_{y,x} + q}{k} \quad (3.1)$$

kde $s_{y,x}$ je směrodatná odchylka lineární regrese (chyba střední hodnoty), q je úsek na ose y a k je směrnice přímky. Hodnota $s_{y,x}$ byla získána pomocí regresní statistiky v programu Microsoft Excel.

Soubory elektrochemických dat byly zpracovány metodami výhledově použitelnými pro automatické počítačové zpracování. Zpracování dat probíhalo v následujících etapách:

- Sběr základního souboru dat využitelných pro automatické počítačové zpracování: křivky cyklické voltametrie a DPV, jejich normování a tvorba databáze. Veškeré odečtené proudové odezvy z cyklických voltamogramů a diferenčních pulzních voltamogramů byly vztaženy na geometrickou plochou elektrody.

- Selektce analyticky významných parametrů: Tvorba databáze parametrů charakteristických pro daný analyt (metoda „*fingerprint*“), graficky zpracovaných do souborů sloupcových grafů simulujících „spektrální“ charakteristiku. Provedení validace funkcí koncentračních (kalibračních) závislostí a funkcí indikujících mechanismus reakce $I_p(v)$, $E_p(v)$, $\Delta E_p(v)$, včetně statistického zpracování odchylek, reprodukovatelnosti. Validace elektrochemických parametrů E_p , I_p , ΔE_p z dat získaných na jednotlivých elektrodách.

- Zpracování voltametrických křivek. Posouzení vzájemné interakce jednotlivých složek analytu porovnáním naměřených voltametrických křivek směsného analytu s křivkami vytvořenými součtem normovaných voltametrických křivek jednotlivých složek.

- Izolace a identifikace píků odpovídajících jednotlivým komponentám ve směsném analytu matematickým porovnáním křivek jednotlivých složek uložených v databázi.

Matematická dekonvoluce křivek směsného analytu byla provedena použitím Gaussovy aproximace v programu Origin v. 6.1.

Vhodnost jednotlivých dekonvolučních technik byla posouzena pomocí vzájemné korelace voltamogramů získaných matematickou operací s voltamogramy jednotlivých komponent analytu uložených v databázi (tj. I_p/E_p dekonvoluční vs. I_p/E_p komponent). Význam korelace je ilustrován na korelačních křivkách voltamogramů se zavedenými definovanými odchylkami (tj. I_p/E_p originál vs. $\Delta I_p/\Delta E_p$).

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

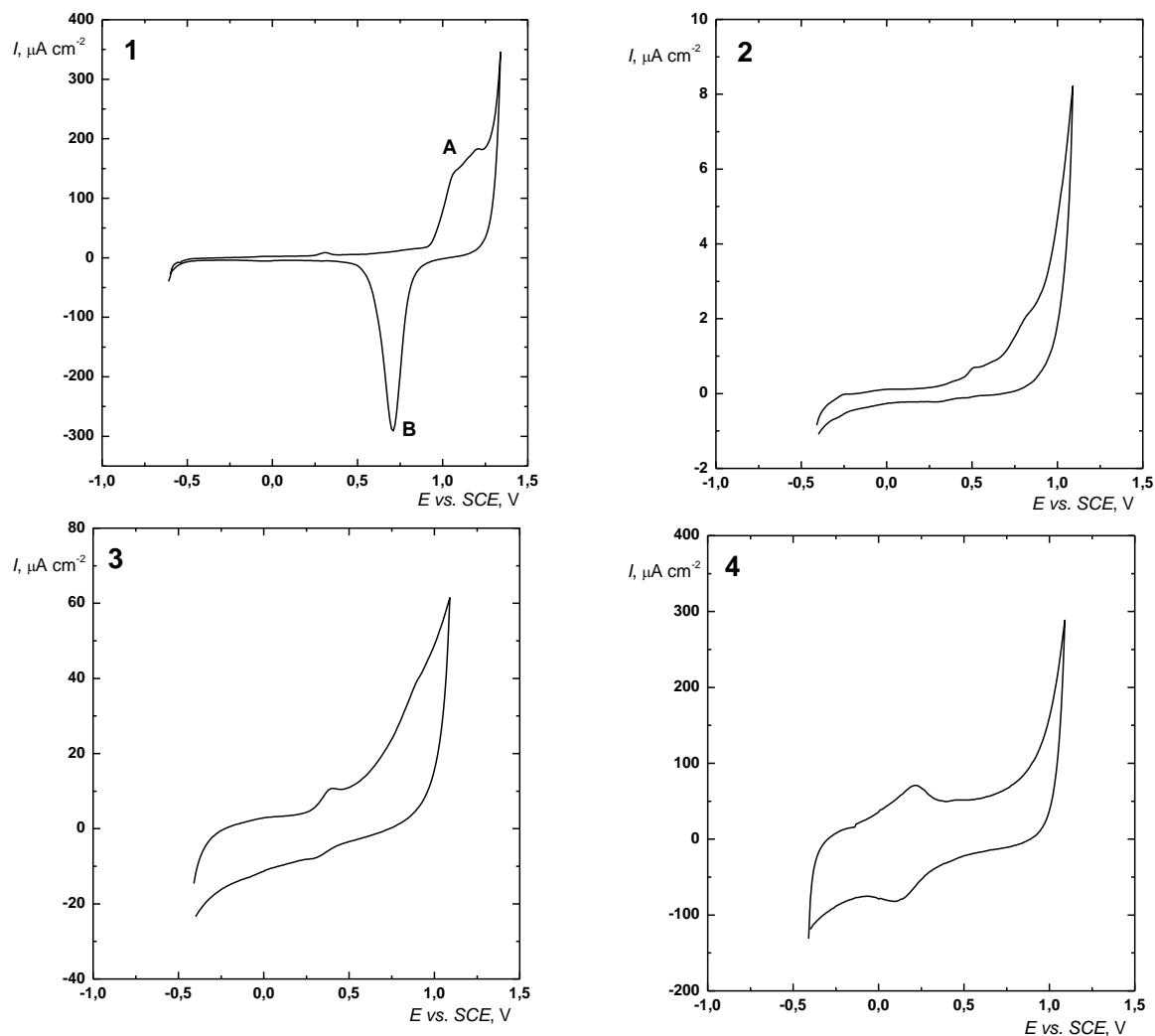
V této kapitole jsou shrnuty naměřené výsledky chování jednotlivých elektrod v základním elektrolytu a v roztocích jednotlivých analytů. Tímto byla vytvořena základní databáze elektrochemických dat, která byla využita při dalším zpracování. Na vytvořené databázi elektrochemických dat je ukázána možnost zpracování dat pomocí dekonvoluce a Gaussovy aproximace a základních matematických operací.

Z individuálních měření jednotlivých látek byly získány parametry charakteristické pro reakce jednotlivých kyselin na zvolených elektrodách.

Z nich je vytvořen parametrický graf, který shrnuje získané výsledky pro jednotlivé analyty na zvoleném souboru elektrod.

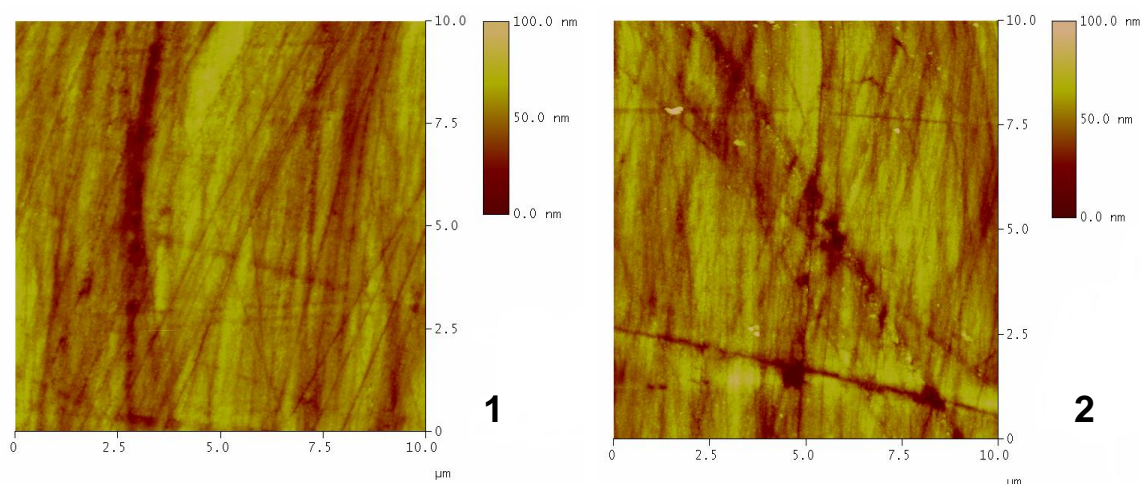
4.1 Elektrochemické chování elektrod v základním elektrolytu

Cyklické voltamogramy pro jednotlivé elektrody při rychlosti vkládání potenciálu 50 mV s^{-1} jsou uvedeny na obr. 4.1. Na cyklickém voltamogramu zlaté elektrody (obr. 4.1 (1)) jsou dva charakteristické píky odpovídající tvorbě oxidů (A) a jejich zpětné redukci (B). Během oxidace a redukce zlatých oxidů dochází k obnovování povrchu zlaté elektrody. Pomineme-li oblast reakce oxidů, nejmenší zbytkové proudy jsou na Au a HOPG, dále pak na GC elektrodě. Zbytkové proudy jsou největší na GCox (předoxidované elektrodě), což lze vysvětlit přítomností oxidických skupin na povrchu elektrody. Tato skutečnost je dokumentována vytvořením píků odpovídajících redox reakci oxidických skupin (obr. 4.1, křivka 4) a XPS analýzou povrchu GC elektrody. Nanomorfologie GCox elektrody ověřená AFM přitom neukázala významnou změnu (nano)drsnosti v důsledku předoxidace. Vytvořené oxidické skupiny podléhají během cyklování elektrody v základním elektrolytu oxidaci a zpětné redukci, což způsobuje navýšení zbytkových proudů.



Obr. 4.1 Cyklické voltamogramy Au (1) (píky A a B představující oxidaci a zpětnou redukci zlatých oxidů), HOPG (2), GC (3) a elektrochemicky předoxidované GC elektrody (4) v základním elektrolytu (10% ethanolický roztok $0,1 \text{ mol dm}^{-3} \text{ NaH}_2\text{PO}_4$) při rychlosti vkládání potenciálu 50 mV s^{-1} .

Pro charakterizaci nanomorfologie povrchu GC nemodifikované a elektrochemicky předoxidované elektrody bylo použito mikroskopie AFM (obr. 4.2). Analýzou drsnosti povrchu byly získány hodnoty uvedené v tabulce 4.1.



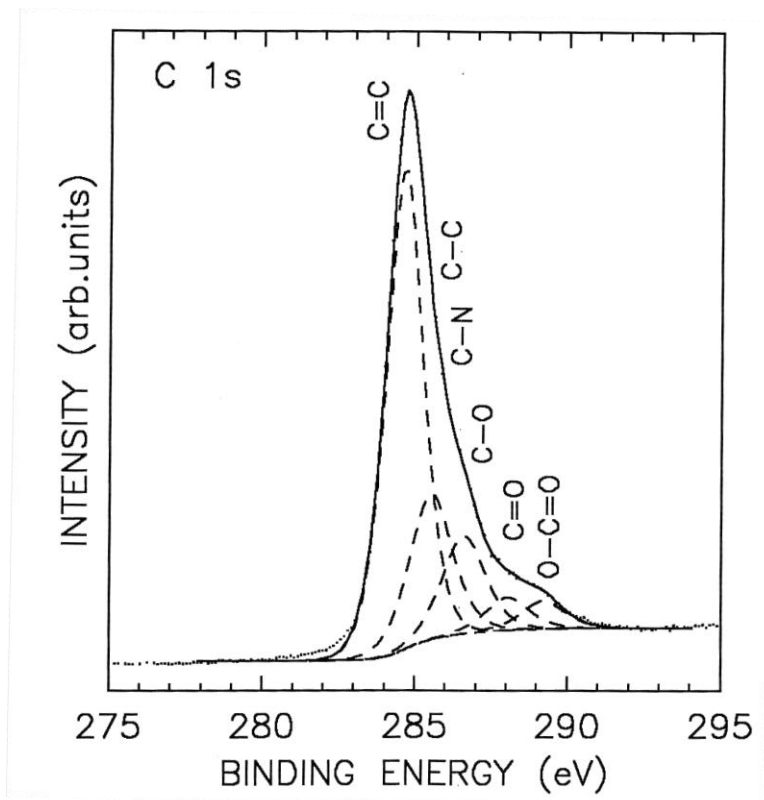
Obr. 4.2 Mikroskopie atomárních sil leštěného GC (1) a GC po anodické oxidaci po dobu 50 sekund v 0,50 mol dm⁻³ kyselině sírové při E = 2,00 V (vs. SCE) (2).

Tab. 4.1 Analýza drsnosti části povrchu elektrody pomocí AFM. Geometrická plocha odpovídá ploše zobrazeného snímku (100,0 μm²), procentuální rozdíl značí o kolik je plocha zobrazeného snímku větší než geometrická plocha zobrazeného snímku.

Elektroda	A_{geom} μm ²	Procentuální rozdíl $\Delta A = (A - A_{\text{geom}})$ %
—		
GC	100,00	+1,43
GCox		+ 2,00

Z hodnot uvedených v tabulce 4.1 plyne, že rozdíl mezi geometrickou plochou (A_{geom}) a skutečnou plochou (A) leštěného a předoxidovaného GC je z hlediska změny proudové hustoty zanedbatelný. Analýza nanodrsnosti povrchu elektrody (tab. 4.1) vycházející z topografie (AFM), ukázala, že zvýšené zbytkové proudy a proudová odezva není způsobena zvětšením povrchu elektrody, nad matematicky vypočtenou geometrickou plochu elektrody. Rýhy na obou snímcích (obr. 4.2 (1, 2)) vznikly během leštícího kroku brusným médiem (diamantová pasta).

Charakterizace chemického složení povrchu elektrody ze skleného uhlíku po anodické oxidaci provedená metodou XPS a ukazuje na přítomnost uhlíkových kyslíkatých skupin na povrchu GC vytvořených anodickou oxidací (obr. 4.3): Vzorek obsahuje v povrchové vrstvě uhlík, kyslík, dusík a malé množství křemíku tj. v atomárních %: C: 82,8, O:15,2, N: 2,0. Obr. 4.3 ukazuje spektrum z XPS analýzy a pravděpodobné přiřazení jednotlivých komponent povrchovým funkčním skupinám.



Obr. 4.3 Spektrum z XPS analýzy a přiřazení jednotlivých komponent povrchovým funkčním skupinám: Vzorek obsahuje v povrchové vrstvě uhlík, kyslík a malé množství křemíku, jak plyne z chemického složení povrchové vrstvy, které odpovídá atomárním % C: 82,8, O:15,2, N: 2,0.

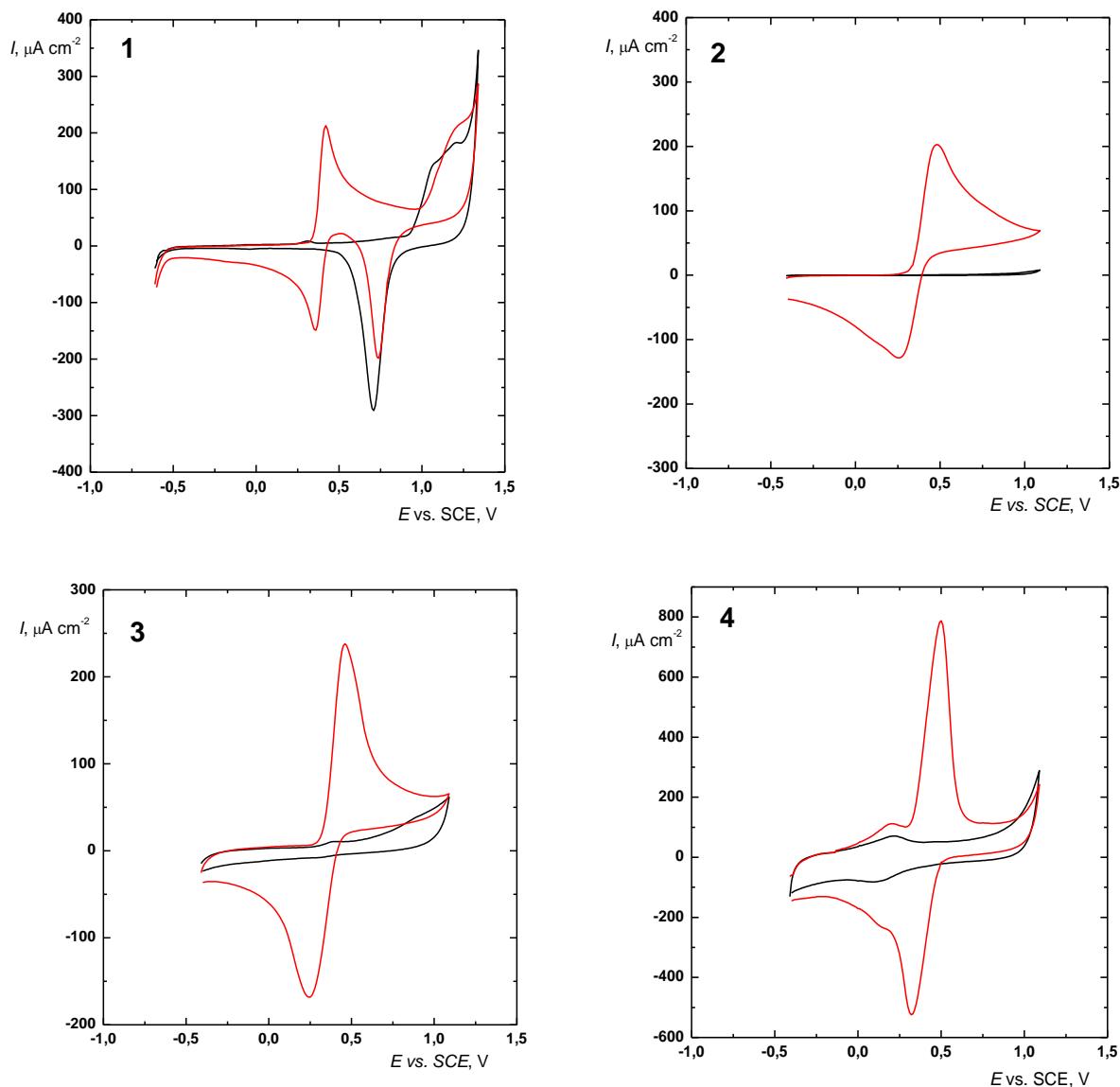
4.2 Kávová kyselina

Naměřené cyklické voltamogramy pro kávovou kyselinu a základního elektrolytu při rychlosti vkládání potenciálu 50 mV s^{-1} jsou zobrazeny na obr. 4.4. Hodnoty $E_{p,A}$ a $E_{p,K}$ jsou uvedeny v tabulce 4.2.

Tab. 4.2 Hodnoty anodických $E_{p,A}$ a katodických $E_{p,K}$ kávové kyseliny naměřené cyklickou voltametří při rychlosti vkládání potenciálu 50 mV s^{-1}

Elektroda	$E_{p,A}$ vs. SCE	$E_{p,K}$ vs. SCE
–	V	V
Au	0,420	0,350
HOPG	0,470	0,260
GC	0,460	0,240
GCox	0,490	0,320

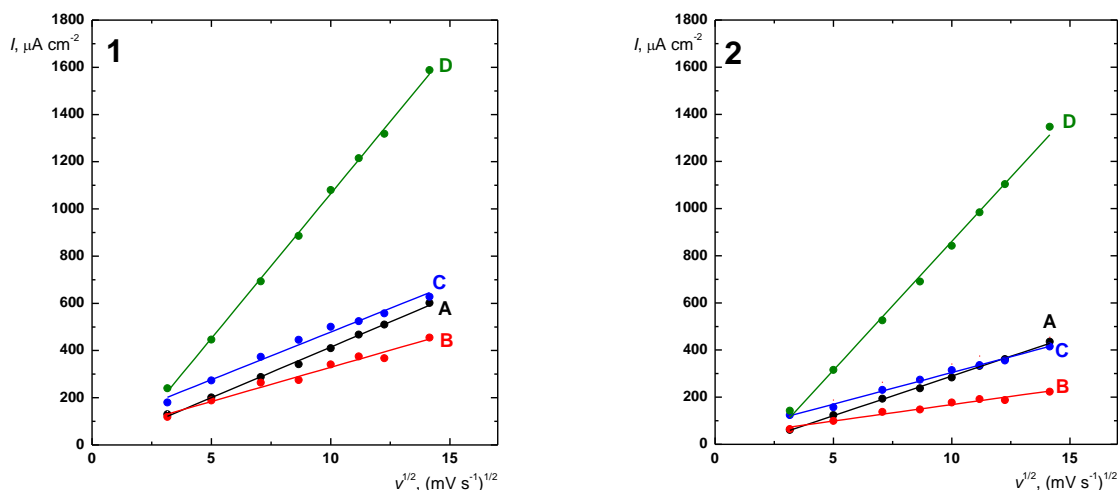
Z obr. 4.4 je patrné, že elektrochemická reakce kávové kyseliny je reverzibilní na Au a GC elektrodě, což je ve shodě s literaturou [33, 34]. Elektrochemie kyseliny kávové na HOPG a GCox není v literatuře popsána, nicméně reverzibilita reakce kávové kyseliny byla potvrzena i v případě HOPG a GCox. Na zlaté elektrodě je zřetelný jeden oxidační pík kávové kyseliny (obr. 4.4 (1)), což je v rozporu s prací [36], kde byly pozorovány dva reverzibilní jednoelektronové anodické píky na Au. Toto lze pravděpodobně vysvětlit použitím $0,5 \text{ mol dm}^{-3} \text{ H}_2\text{SO}_4/\text{aceton}$ v práci [36], či rozdílnou rychlostí vkládání potenciálu na elektrodu. Přítomnost acetonu společně s kyselinou sírovou v základním elektrolytu pravděpodobně potlačuje disociaci kávové kyseliny, což může ovlivňovat jednak mechanismus reakce, který může probíhat jiným způsobem, či rozdílnou afinitu kávové kyseliny k elektrodovému povrchu.



Obr. 4.4 Cyklické voltamogramy kávové kyseliny ($c = 6,5 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) znázorněné červenou barvou a základního elektrolytu (10% ethanolický roztok $0,1 \text{ mol dm}^{-3} \text{ NaH}_2\text{PO}_4$) znázorněné černou barvou, na Au (1), HOPG (2), GC (3) a GCox (4) při rychlosti vkládání potenciálu 50 mV s^{-1} .

Na obr. 4.5 (1, 2) jsou uvedeny závislosti proudové odezvy $I_{p,A}$ a $I_{p,K}$ na druhé odmocnině rychlosti polarizace elektrody. Tyto lineární závislosti vypovídají, že elektrochemická reakce kávové kyseliny je difúzně řízená na všech použitých elektrodách, což je ve shodě s literaturou [19, 34]. Parametry lineárních regresí rychlostních závislostí jsou uvedeny v tabulce 4.3. Zvýšení hodnoty $I_{p,A}$, $I_{p,K}$ a směrnice $I_{p,A} (v^{1/2})$ získané na GCox elektrodě pro kávovou kyselinu lze vysvětlit zapojením

oxidických skupin předem vytvořených na povrchu GCox elektrody do kinetiky reakce, kde katalyzují průběh dvouelektronové kvazireverzibilní reakce v jediném kroku [16]. Na rozdíl od ostatních elektrod, kde reakce probíhá rovněž kvazireverzibilně ($\Delta E_p > 2,3RT/nF$), pouze v rozsahu prvního jednoelektronového kroku.



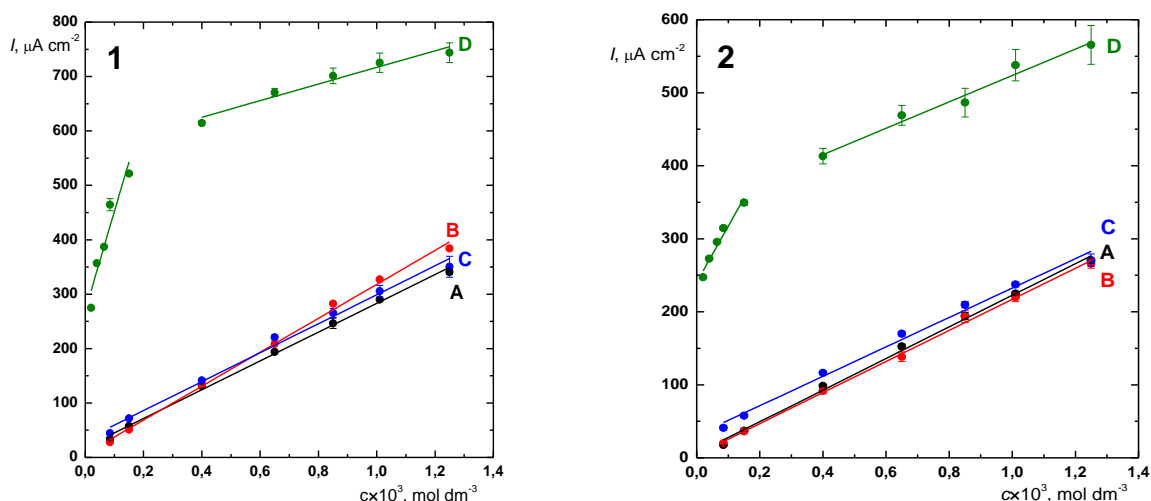
Obr. 4.5 Závislost $I_{p,A}$ a $I_{p,K}$ na $v^{1/2}$ pro kávovou kyselinu ($c = 1,00 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) na Au (A), HOPG (B), leštném GC (C) a GCox pro anodické proudy (1), pro katodické proudy (2).

Tab. 4.3 Směrnice, úseky a korelační koeficienty lineárních regresí závislosti $I_{p,A}$ a $I_{p,K}$ na $v^{1/2}$ pro kávovou kyselinu naměřené cyklickou voltametří.

Elektroda	k_A	q_A	R_A	k_K	q_K	R_K
–	$\frac{\mu\text{A cm}^{-2}}{(\text{mV s}^{-1})^{1/2}}$	$\mu\text{A cm}^{-2}$	–	$\frac{\mu\text{A cm}^{-2}}{(\text{mV s}^{-1})^{1/2}}$	$\mu\text{A cm}^{-2}$	–
Au	42,83	–13,90	0,9988	33,62	–46,83	0,9993
HOPG	28,95	39,40	0,9935	13,93	29,07	0,9969
GC	40,36	74,50	0,9888	26,83	36,15	0,9874
GCox	122,6	–161,7	0,9995	109,2	–231,7	0,9987

Metodou cyklické voltametrie byly naměřeny kalibrační závislosti pro kávovou kyselinu na jednotlivých elektrodách (Au, HOPG, GC a GCox). Naměřené závislosti společně s chybovými úsečkami jsou zobrazeny na obrázku 4.6. Vypočtené parametry lineárních regresí kalibračních přímek jsou uvedeny v tab. 4.4 a 4.5. Jak je patrné z obrázku 4.6 (1), kalibrační závislosti kávové kyseliny pro anodické proudové odezvy jsou lineární v celém koncentračním rozsahu na zlaté, HOPG a GC elektrodě.

Navýšení směrnice kalibrační křivky kyseliny kávové na GCox (obr. 4.6 (1, 2), křivky D) v prvních bodech a její zlom, kdy směrnice získává hodnotu blízkou směrnici ostatních látek na odpovídajících elektrodách, lze vysvětlit opět katalytickým působením oxidických skupin vytvořených na GCox (obr. 4.3), jejichž účinek je postupně inhibován depozicí nerozpustného produktu oxidace kyseliny kávové (polymeru) [35, 57], vytvářeného zvláště při vyšších koncentracích. Tato odezva je specifická pro elektrochemickou reakci kyseliny kávové na GCox.



Obr. 4.6 Závislosti $I_{p,A}$ (1) a $I_{p,K}$ (2) na koncentraci kávové kyseliny v 10% ethanolickém roztoku 0,1 mol dm⁻³ NaH₂PO₄ na Au (A), HOPG (B), GC (C) a GCox (D), naměřené cyklickou voltametří při rychlosti vkládání potenciálu 50 mV s⁻¹.

Přes vytvořený film je elektroda stále elektrochemicky aktivní a umožňuje elektrochemickou oxidaci kávové kyseliny, i když pravděpodobně již bez zapojení povrchových oxidických skupin GCox. Změnou elektrodového materiálu lze tak výrazně ovlivnit citlivost stanovení kávové kyseliny.

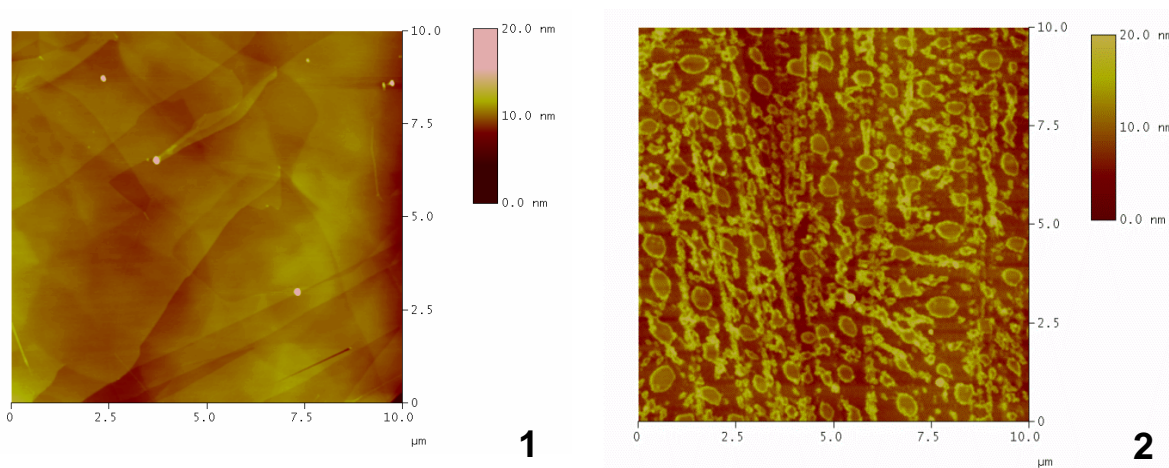
Tab. 4.4 Směrnice, úseky a korelační koeficienty kalibračních rovnic a pro anodické proudové odezvy kávové kyseliny naměřené cyklickou voltametrií při rychlosti vkládání potenciálu 50 mV s^{-1} .

Elektroda	k	$q \times 10^3$	R	$\text{LOD} \times 10^4$
–	$\frac{\text{mA dm}^3}{\text{mol cm}^2}$	mA cm^{-2}	–	mol dm^{-3}
Au	264,4	18,79	0,9987	1,44
HOPG	311,9	6,24	0,9985	0,992
GC	266,1	32,82	0,9962	2,50
GCx	152,7	563,0	0,9804	A
	1824	269,0	0,9551	B
Pozn. (A) lineární dynamický rozsah od 4×10^{-4} do $1,25 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ (B) lineární dynamický rozsah od $2,0 \times 10^{-5}$ do $1,50 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$				

Tab. 4.5 Směrnice, úseky a korelační koeficienty kalibračních rovnic pro katodické proudové odezvy kávové kyseliny naměřené cyklickou voltametrií při rychlosti vkládání potenciálu 50 mV s^{-1} .

Elektroda	k	$q \times 10^3$	R	$\text{LOD} \times 10^4$
–	$\frac{\text{mA dm}^3}{\text{mol cm}^2}$	mA cm^{-2}	–	mol dm^{-3}
Au	216,5	6,11	0,9983	1,13
HOPG	212,8	4,31	0,9989	0,883
GC	201,4	33,1	0,9963	2,80
GCox	180,6	344	0,9881	A
	766,5	240	0,9816	B
Pozn. (A) lineární dynamický rozsah od 4×10^{-4} do $1,25 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ (B) lineární dynamický rozsah od $2,0 \times 10^{-5}$ do $1,50 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$				

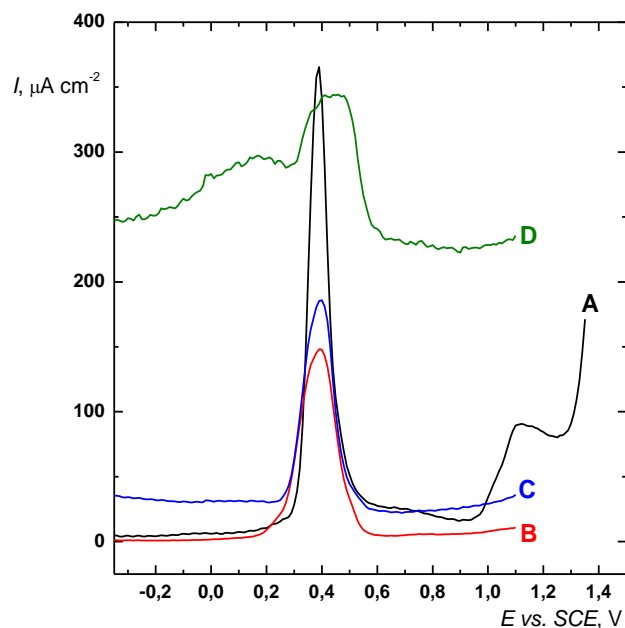
Existenci filmu vytvořeného elektrochemickou depozicí z roztoku kyseliny kávové lze potvrdit rovněž zobrazením povrchu elektrody mikroskopií AFM před (obr. 4.7 (1)) a po elektrochemické oxidaci kyseliny kávové (obr. 4.7(2)). Pro tyto účely bylo použito dobře definovaného čerstvě sloupnutého povrchu bazální roviny HOPG.



Obr. 4.7 Snímky AFM čisté bazální roviny HOPG (1) a HOPG elektrody (2) po cyklické voltametii kávové kyseliny (po 10 cyklech) v 10% ethanolickém roztoku $0,1 \text{ mol dm}^{-3} \text{ NaH}_2\text{PO}_4$ o $\text{pH} = 4,00$ při rychlosti vkládání potenciálu 50 mV s^{-1} .

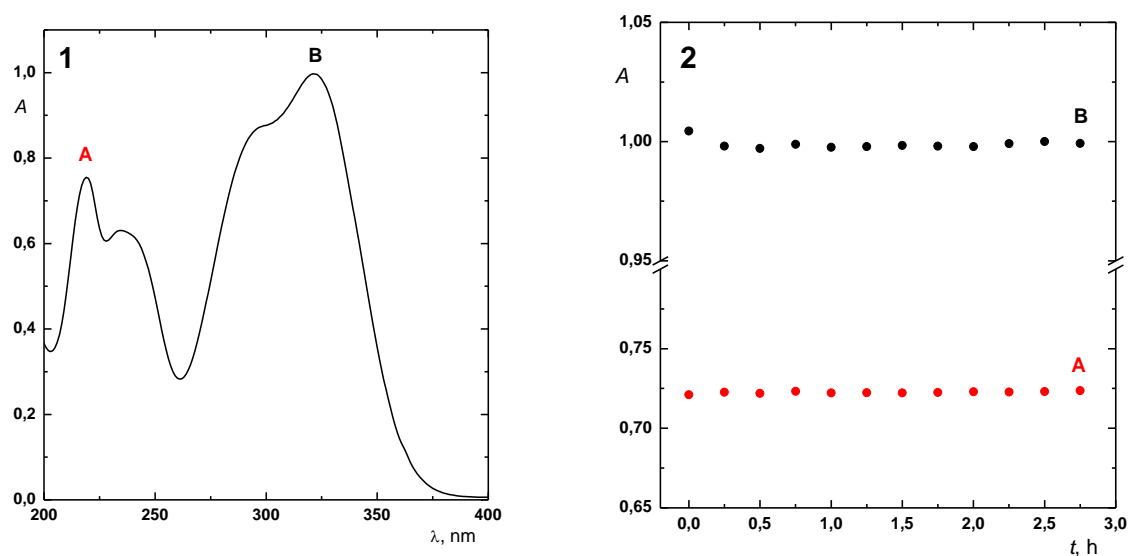
Na povrchu HOPG elektrody po cyklické voltametii kávové kyseliny je zřetelně viditelný depozit produktu elektrochemické reakce kávové kyseliny (obr. 4.7 (2)). Vzniklý depozit, který pravděpodobně zpomaluje kinetiku elektrochemické reakce kávové kyseliny lze využít pro zvýšení selektivity stanovení kávové kyseliny ve směsích s možnými interferenty, bez nutnosti předchozí separace [35, 37].

Na obr. 4.8 jsou zobrazeny DP voltamogramy kávové kyseliny ($c = 6,5 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) na všech elektrodových materiálech (Au, HOPG, GC a GCox). Rozdílnou velikost DPV píků kávové kyseliny lze vysvětlit pravděpodobnými rozdíly v kinetice průběhu oxidace kávové kyseliny na různých elektrodových materiálech. Potenciál vrcholu DPV píku se shoduje s $E_{p/2}$ cyklické voltametrie. Deformace píku DPV na GCox elektrodě (obr. 4.8 D) lze přičíst přítomnosti vysoké povrchové koncentrace oxidických skupin vytvořených právě na GCox (viz obr. 4.1, křivka 4).



Obr. 4.8 Diferenční pulzní voltamogramy kávové kyseliny ($c = 6,5 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) na Au (A), HOPG (B), GC (C) a CGox (D) při rychlosti vkládání potenciálu 50 mV s^{-1} a velikosti pulzu 25 mV a době pulzu 0,02 s.

Stabilita zásobního roztoku kávové kyseliny byla sledována spektrofotometricky po dobu 3 hodin, kdy každých 15 minut byla změřena absorbance kávové kyseliny v absorpčních maximech. Absorpční spektrum kávové kyseliny se dvěma absorpčními maximy 216 nm (A) a 321 nm (B) je uvedeno na obr. 4.9 (1). Kinetické měření stability kávové kyseliny při zvolených vlnových délkách λ_{MAX} je uvedeno na obr. 4.9 (2).



Obr. 4.9 Absorpční spektrum kávové kyseliny ($5,0 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) (1) a kinetické měření stability kávové kyseliny (2).

4.3 Askorbová kyselina

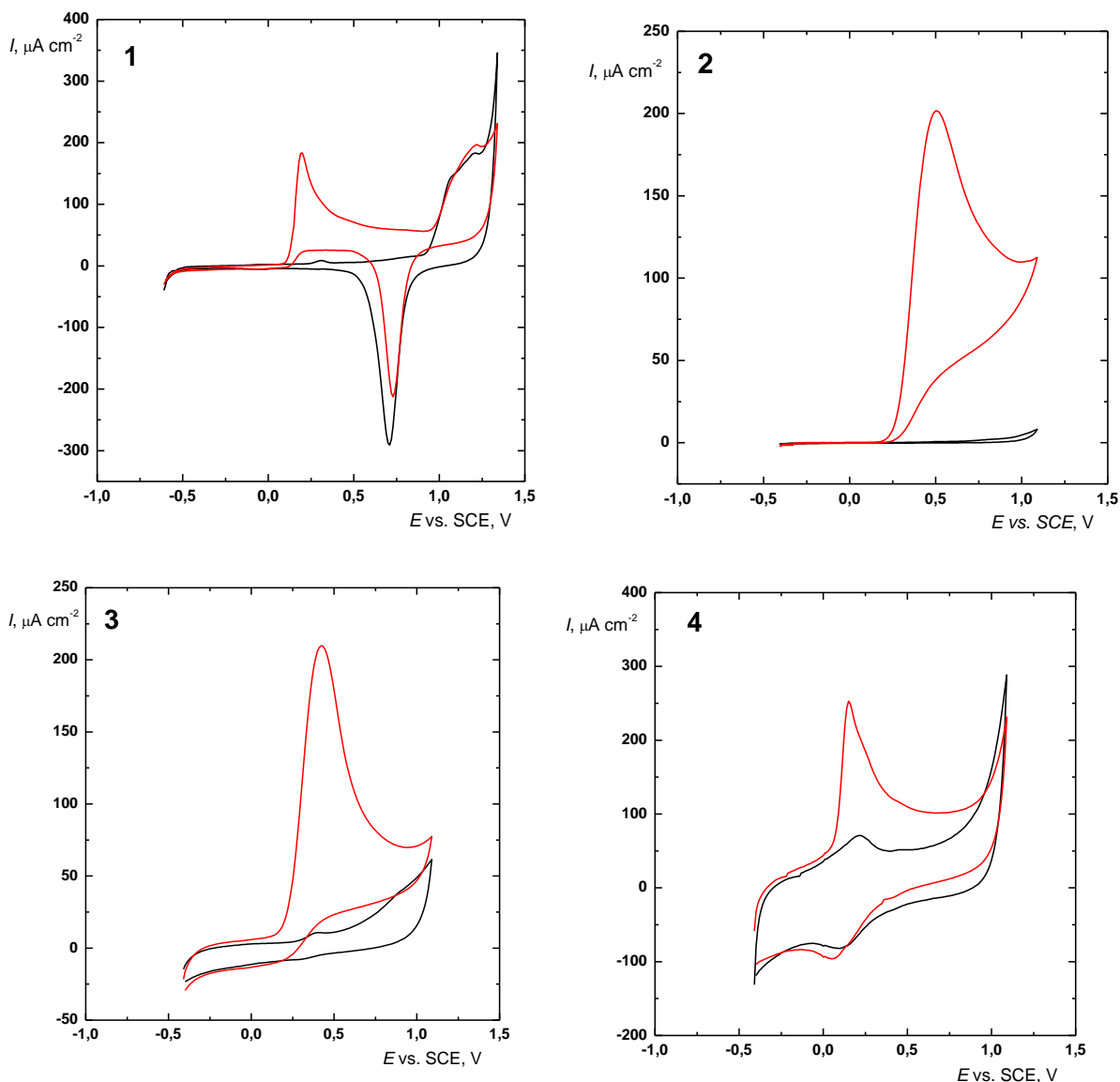
Cyklické voltamogramy pro askorbovou kyselinu ($c = 6,5 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) a základní elektrolyt na použitých elektrodách jsou zobrazeny na obr. 4.10. Odečtené hodnoty $E_{p,A}$ vs. SCE jsou uvedeny v tabulce 4.6.

Tab. 4.6 Hodnoty anodických $E_{p,A}$ askorbové kyseliny naměřené cyklickou voltametrií při rychlosti vkládání potenciálu 50 mV s^{-1}

Elektroda	$E_{p,A}$ vs. SCE
–	V
Au	0,190
HOPG	0,500
GC	0,420
GCox	0,150

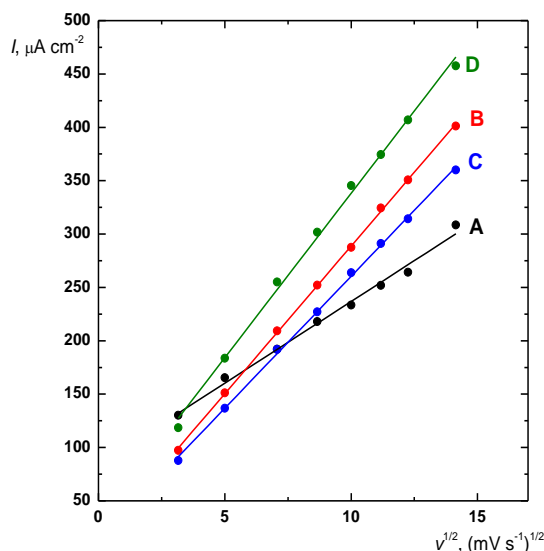
Z cyklických voltamogramů uvedených na obr. 4.10 je patrné, že elektrochemická oxidace askorbové kyseliny probíhá na všech elektrodových materiálech (Au, HOPG, GC a GCox) velmi podobně, ireverzibilním způsobem. Dostupná literatura [42, 44, 45] popisuje elektrochemickou oxidaci kyseliny askorbové na všech zde použitých elektrodách Au, GC a GCox. V literatuře není zmínka o elektrochemickém chování askorbové kyseliny na HOPG elektrodě, kde jsem však zjistil rovněž ireverzibilní průběh, jak ukazuje obr. 4.10, křivka 2. Podíváme-li se na hodnoty potenciálů odpovídající oxidaci askorbové kyseliny (tab. 4.6) je patrné, že k její oxidaci dochází při různých hodnotách potenciálů na elektrodách z různých materiálů. Zde se uplatňuje vliv materiálu elektrody [11] především na kinetiku reakce. Proto je hodnota $E_{p,A}$ jeden z vhodných parametrů pro stanovení askorbové kyseliny ve směsných vzorcích za použití víceelektrodrového systému, za předpokladu, že nedochází k interakci s ostatními analyty přítomnými ve vzorku.

Nejpozitivnější hodnota $E_{p,A}$ byla dosažena na HOPG, který byl z důvodu vysoké inertnosti zvolen jako referenční. Nejnižšího přepětí oxidace askorbové kyseliny bylo dosaženo na GCox elektrodě. Toto lze opět vysvětlit přítomnými oxidickými skupinami na povrchu elektrody, urychlujícími kinetiku elektrochemického děje.



Obr. 4.10 Cyklické voltamogramy askorbové kyseliny ($c = 6,5 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) znázorněné červenou barvou a základního elektrolytu (10% ethanolický roztok $0,1 \text{ mol dm}^{-3} \text{ NaH}_2\text{PO}_4$) znázorněné černou barvou na Au (1), HOPG (2), GC (3) a GCox (4), při rychlosti ukládání potenciálu 50 mV s^{-1} .

Závislosti proudové odezvy na druhé odmocnině rychlosti polarizace elektrody, jsou zobrazeny na obr. 4.11. Lineární průběh těchto závislostí na všech elektrodách značí, že elektrochemická oxidace askorbové kyseliny je řízena difuzí, což je ve shodě s literaturou [44]. Vypočtené parametry lineárních regresí závislosti $I_{p,A}$ na $v^{1/2}$ pro askorbovou kyselinu na jednotlivých elektrodách jsou uvedeny v tabulce 4.7. Pokles směrnice I_p ($v^{1/2}$) na Au elektrodě (obr. 4.11 křivka A), lze vysvětlit možnou deaktivací elektrody.

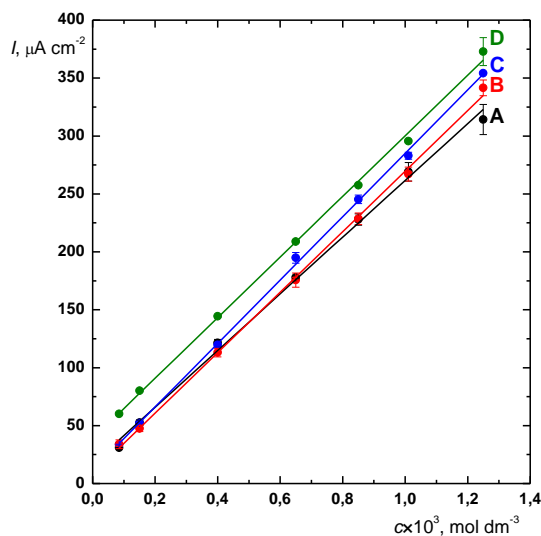


Obr. 4.11 Závislost $I_{p,A}$ na druhé odmocnině rychlosti polarizace elektrody ($v^{1/2}$) pro askorbovou kyselinu ($c = 1,00 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) na elektrodách Au (A), HOPG (B), GC (C) a GCox (D).

Tab 4.7 Směrnice, úseky a korelační koeficienty lineárních regresí závislosti $I_{p,A}$ na $v^{1/2}$ pro askorbovou kyselinu na použitých elektrodách naměřené cyklickou voltametrií.

Elektroda	k	q	R
—	$\frac{\mu\text{A cm}^{-2}}{(\text{mV s}^{-1})^{1/2}}$	$\mu\text{A cm}^{-2}$	—
Au	15,31	83,70	0,9962
HOPG	27,67	12,01	0,9996
GC	24,73	13,13	0,9998
GCox	30,82	30,06	0,9985

Metodou cyklické voltametrie byly naměřeny kalibrační závislosti pro askorbovou kyselinu na jednotlivých elektrodách (Au, HOPG, GC a GCox), tyto závislosti jsou společně s chybovými úsečkami zobrazeny na obrázku 4.12. Relativní směrodatná odchylka měření ($n = 3$) byla do 5 %. Jak je patrné z obrázku 4.12, kalibrační závislosti askorbové kyseliny jsou lineární v celém koncentračním rozsahu. Pro askorbovou kyselinu byla vypočtena mez detekce na jednotlivých elektrodách, vypočtené hodnoty jsou uvedeny v tabulce 4.8 společně s parametry kalibračních přímek.



Obr. 4.12 Kalibrační závislost $I_{p,A}$ na koncentraci askorbové kyseliny v 10% ethanolickém roztoku $0,1 \text{ mol dm}^{-3} \text{ NaH}_2\text{PO}_4$ na elektrodách Au (A), HOPG (B), GC (C) a GCox (D), naměřené cyklickou voltametrií při rychlosti vkládání potenciálu 50 mV s^{-1} .

Směrnice kalibračních závislostí pro askorbovou kyselinu (obr. 4.12) jsou velmi podobné pro všechny elektrody (tab. 4.8). U oxidace kyseliny askorbové na GCox lze tedy předpokládat jen nepatrný vliv oxidických skupin na její elektrochemickou reakci.

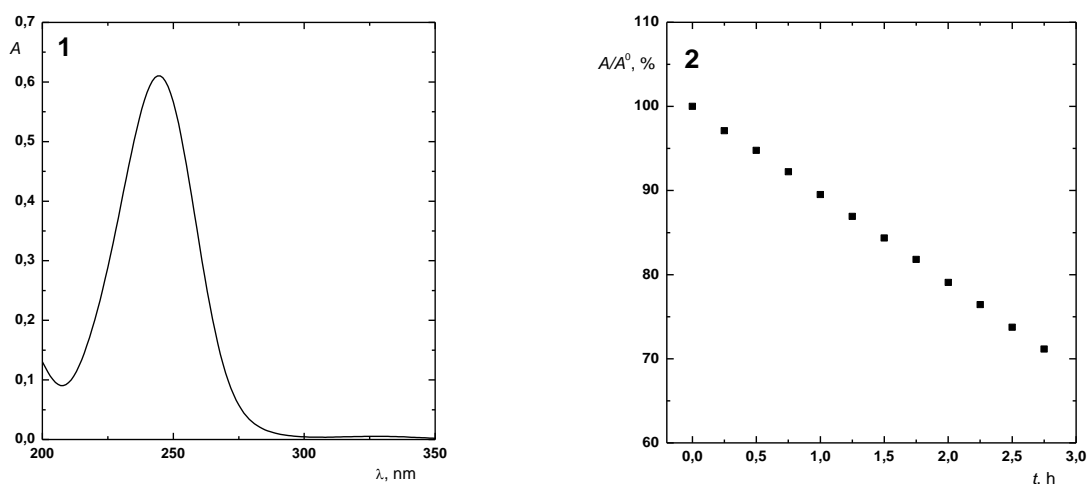
Tab. 4.8 Směrnice, úseky a korelační koeficienty kalibračních rovnic a LOD pro askorbovou kyselinu naměřené cyklickou voltametrií při rychlosti vkládání potenciálu 50 mV s^{-1}

Elektroda	k	$q \times 10^3$	R	$\text{LOD} \times 10^4$
–	$\frac{\text{mA dm}^3}{\text{mol cm}^2}$	mA cm^{-2}	–	mol dm^{-3}
Au	244,8	16,9	0,9986	1,47
HOPG	261,2	8,5	0,9994	0,814
GC	265,8	11,4	0,9984	1,28
GCox	261,6	38,5	0,9992	2,04

Vypočtené limity detekce pro askorbovou kyselinu na Au a GCox elektrodě jsou větší než změřený koncentrační bod kalibrační závislosti o nejnižší koncentraci. Askorbovou kyselinu lze na Au a GCox elektrodě detekovat i pro koncentrace o jeden řád nižší. Možnost detekce koncentračního bodu, který je nižší než vypočtená hodnota

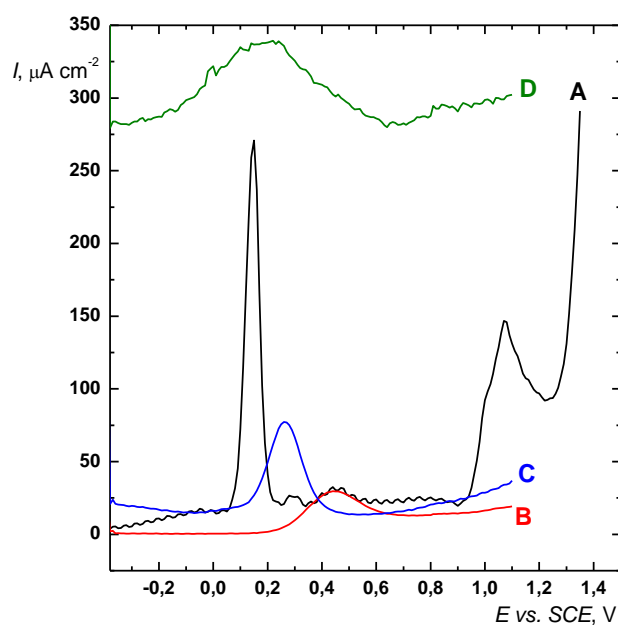
LOD by mohl být vysvětlen statistickým přístupem k výpočtu limitu detekce. Tento výpočet nezahrnuje možné interakce a chování pevných elektrod. Limity detekce vypočtené pro HOPG a GC elektrodu jsou nižší než nejnižší použitý koncentrační bod kalibrační závislosti.

Stabilita zásobního roztoku askorbové kyseliny byla měřena spektrofotometricky po dobu 3 hodin, kdy každých 15 minut byla změřena absorbance askorbové kyseliny při zvolené vlnové délce odpovídající absorpčnímu maximu 247 nm (obr 4.13 (1)). Kinetické měření stability askorbové kyseliny při zvolené vlnové délce λ_{MAX} je uvedeno na obr. 4.13 (2). Askorbová kyselina podléhá rychlé degradaci pravděpodobně vlivem vzdušného kyslíku, z tohoto důvodu byl její zásobní roztok o koncentraci $5 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ připravován před každým měřením čerstvý, aby ovlivnění elektrochemických výsledků vlivem časové nestability roztoku analytu bylo co nejvíce eliminováno.



Obr. 4.13 Spektrum askorbové kyseliny ($c = 5 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) (1) a kinetické měření stability askorbové kyseliny (2).

Na obr. 4.14 jsou zobrazeny diferenční pulzní voltamogramy askorbové kyseliny ($c = 6,5 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) na všech elektrodoých materiálech (Au, HOPG, GC a GCox). Rozdílnou velikost DPV pík askorbové kyseliny lze vysvětlit různou kinetikou oxidace askorbové kyseliny na těchto elektrodách a vlivem zvolených parametrů (ν , τ , ΔE) DPV experimentu. Hodnota E_{DPV} je shodná s $E_{\text{p}/2}$. Deformace píku na GCox elektrodě (obr. 4.14 D) lze přičíst konvoluci oxidace kyseliny askorbové a povrchových oxidických skupin, podobně, jako tomu bylo u kyseliny kávové.



Obr. 4.14 Diferenční pulzní voltamogramy askorbové kyseliny ($c = 6,5 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) na Au (A), HOPG (B), GC (C) a CGox (D) při rychlosti vkládání potenciálu 50 mV s^{-1} , velikosti pulzu 25 mV a době pulzu $0,02 \text{ s}$.

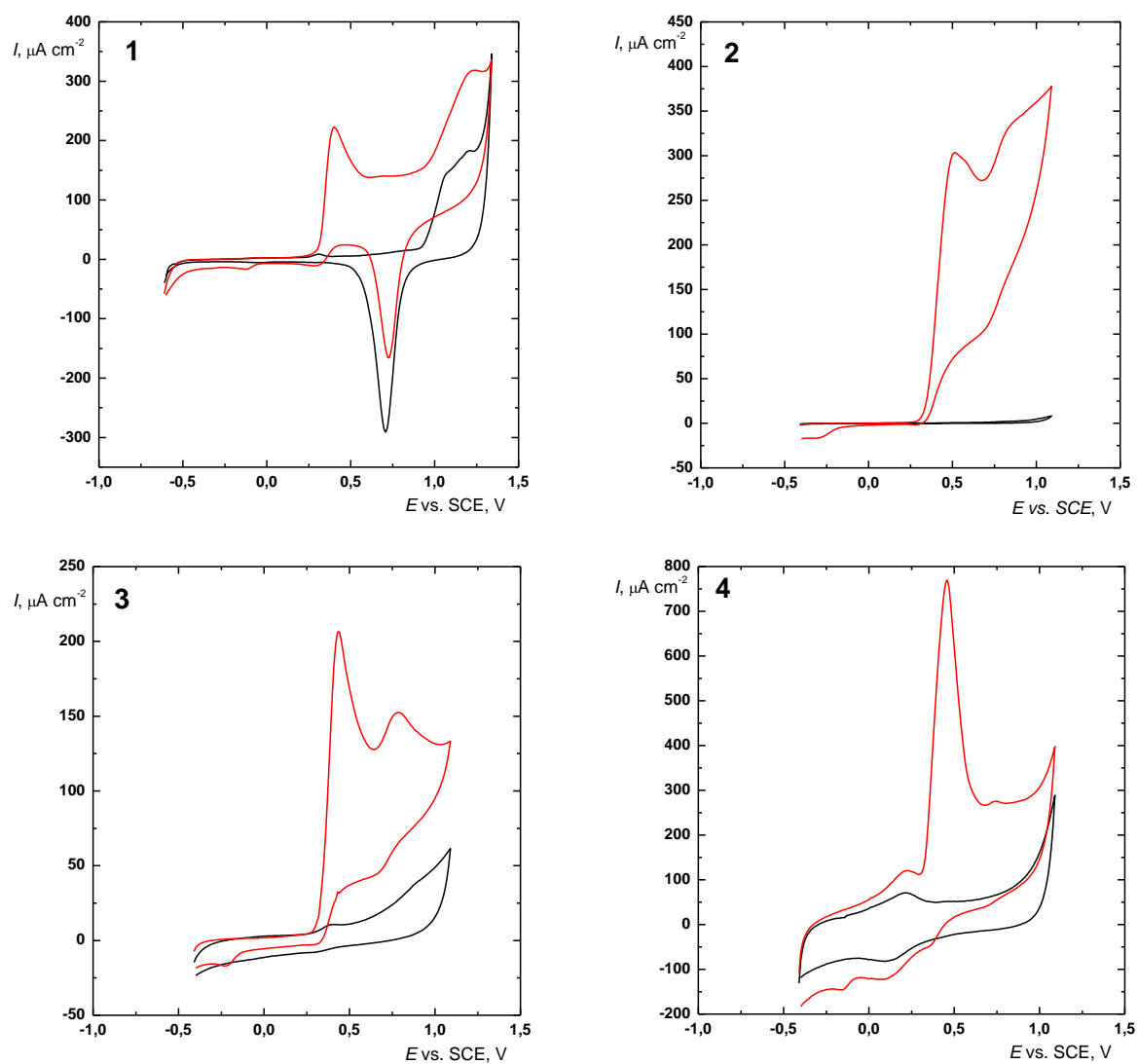
4.4 Gallová kyselina

Cyklické voltamogramy gallové kyseliny ($c = 6,5 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) na použitých elektrodách společně se základním elektrolytem 10% ethanolického roztoku $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ dihydrogenfosforečnanu sodného o $\text{pH} = 4,00$ jsou zobrazeny na obr. 4.15. Naměřené hodnoty $E_{p,A}$ jsou uvedeny v tabulce 4.9.

Tab. 4.9 Hodnoty anodických $E_{p,A}$ gallové kyseliny naměřené cyklickou voltametří při rychlosti vkládání potenciálu 50 mV s^{-1} .

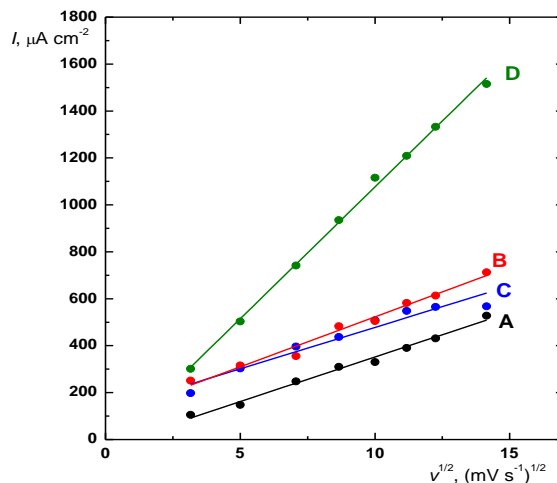
Elektroda	$E_{p,A}$ vs. SCE
–	V
Au	0,400
HOPG	0,500
GC	0,430
GCoX	0,450

Cyklické voltamogramy na obr. 4.15 ukazují ireverzibilní průběh elektrochemické oxidace gallové kyseliny na všech použitých elektrodách. Ireverzibilitu na GC potvrzuje i dostupná literatura [8, 52]. Ireverzibilní chování bylo nalezeno i na Au, HOPG a GCoX (obr. 4.15 (1, 2 a 4)). Na GC (obr. 4.15 (3)) a HOPG (obr. 4.15 (2)) jsou rozlišitelné dva píky odpovídající dvěma jedoelektronovým krokům reakce. Stejně výsledky pro GC jsou publikovány v práci [8, 53]. V případě Au elektrody (obr. 4.15 (1)) 2. krok reakce probíhá v oblasti elektrochemické tvorby oxidů, zatímco na GCoX anodický pík vznikl pravděpodobně sloučením obou kroků dvou elektronové reakce.



Obr. 4.15 Cyklické voltamogramy gallové kyseliny ($c = 6,5 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) znázorněné červenou barvou a základního elektrolytu (10% ethanolický roztok $0,1 \text{ mol dm}^{-3} \text{ NaH}_2\text{PO}_4$) znázorněné černou barvou na elektrodách Au (1), HOPG (2), GC (3) a GCox (4) při rychlosti ukládání potenciálu 50 mV s^{-1} .

Na obr. 4.16 jsou uvedeny naměřené závislosti proudové odezvy $I_{p,A}$ na druhé odmocnině rychlosti polarizace elektrody. Ze získaných závislostí je zřejmé, že elektrochemický děj je difúzně řízený na všech použitých elektrodách, jak dokazuje lineární průběh závislosti $I_{p,A}$ na $v^{1/2}$. Vypočtené parametry lineárních regresí závislosti $I_{p,A}$ na $v^{1/2}$ jsou uvedeny v tab. 4.10.



Obr. 4.16 Závislost $I_{p,A}$ na druhé odmocnině rychlosti polarizace elektrody naměřené cyklickou voltametří pro gallovou kyselinu ($c = 1,00 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) na Au (A), HOPG (B), GC (C) a GCox (D).

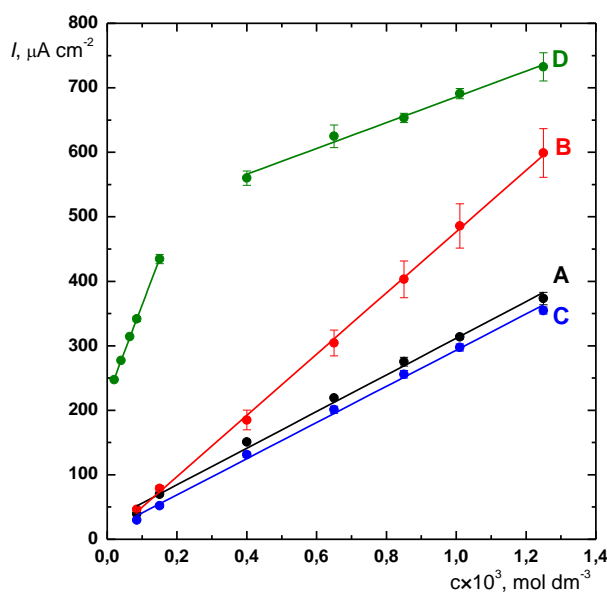
Tab 4.10 Směrnice, úseky a korelační koeficienty lineárních regresí závislosti $I_{p,A}$ na $v^{1/2}$ pro gallovou kyselinu naměřené cyklickou voltametří na jednotlivých elektrodách.

Elektroda	k	q	R
—	$\frac{\mu\text{A cm}^{-2}}{(\text{mV s}^{-1})^{1/2}}$	$\mu\text{A cm}^{-2}$	—
Au	38,00	−28,26	0,9950
HOPG	45,50	97,62	0,9912
GC	35,34	124,5	0,9720
GCox	112,4	−47,11	0,9990

Metodou cyklické voltametrie byly naměřeny kalibrační závislosti pro gallovou kyselinu na jednotlivých elektrodách (Au, HOPG, GC a GCox), naměřené závislosti společně s chybovými úsečkami jsou zobrazeny na obrázku 4.17. Vypočtené parametry lineárních regresí kalibračních přímk jsou uvedeny v tab. 4.11. Jak je patrné z obrázku 4.17, kalibrační závislosti gallové kyseliny jsou lineární v celém koncentračním rozsahu na zlaté, HOPG a GC elektrodě.

Podobně jako v případě kyseliny kávové navýšení směrnice kalibrační křivky kyseliny gallové na GCox (obr. 4.17, křivka D) v prvních bodech a její zlom, kdy směrnice získává hodnotu blízkou směrnici ostatních látek na odpovídajících elektrodách, lze vysvětlit katalytickým působením oxidických skupin vytvořených na GCox (obr. 4.3), jejichž účinek je postupně inhibován depozicí/adsorpcí nerozpustného produktu oxidace kyseliny gallové [75] rovněž vytvářeného při vyšších koncentracích a delším působení vloženého potenciálu oxidace ($E_{p,A}$).

Pro gallovou kyselinu byly vypočteny meze detekce na jednotlivých elektrodách, vypočtené hodnoty jsou uvedeny v tabulce 4.11.



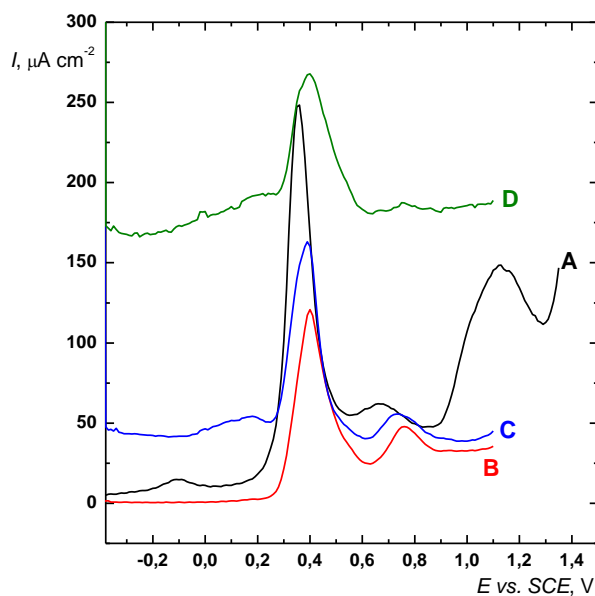
Obr. 4.17 Kalibrační závislost $I_{p,A}$ na koncentraci gallové kyseliny v 10% ethanolickém roztoku $0,1 mol dm^{-3} NaH_2PO_4$ na Au (A), HOPG (B), GC (C) a GCox (D). Cyklická voltametrie při rychlosti vkládání potenciálu $50 mV s^{-1}$.

Tab. 4.11 Směrnice, úseky a korelační koeficienty kalibračních rovnic a LOD pro gallovou kyselinu naměřené cyklickou voltametří při rychlosti vkládání potenciálu 50 mV s⁻¹

Elektroda	k	q×10 ³	R	LOD×10 ⁴
–	$\frac{\text{mA dm}^3}{\text{mol cm}^2}$	mA cm ⁻²	–	mol dm ⁻³
Au	284,1	27,67	0,9977	1,95
HOPG	474,6	2,32	0,9997	0,42
GC	280,4	12,77	0,9988	1,17
GCox	199,9	486,0	0,9958	A
	1434	219,8	0,9993	B
Pozn. (A) lineární dynamický rozsah od 4×10 ⁻⁴ do 1,25×10 ⁻³ mol dm ⁻³				
(B) lineární dynamický rozsah od 2,0×10 ⁻⁵ do 1,50×10 ⁻⁴ mol dm ⁻³				

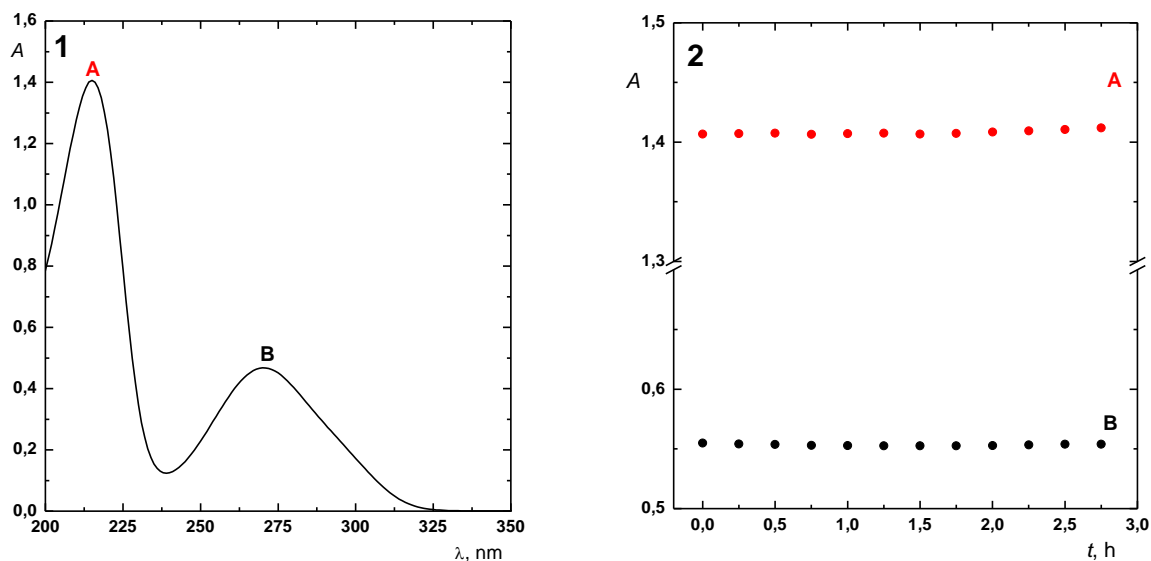
Vypočtené limity detekce pro gallovou kyselinu na Au a GC elektrodě jsou větší než změřený koncentrační bod kalibrační závislosti o nejnižší koncentraci. Gallovou kyselinu lze na Au a GC elektrodě detekovat i pro koncentrace o jeden řád nižší, tak jako askorbovou kyselinu na Au a GCox, jak již bylo uvedeno dříve.

Na obr. 4.18 jsou zobrazeny diferenční pulzní voltamogramy gallové kyseliny ($c = 6,5 \times 10^{-4}$ mol dm⁻³) na všech elektrodových materiálech (Au, HOPG, GC a GCox). Tak jako v předchozích případech i zde je diferenční pulzní voltamogram kyseliny gallové na GCox deformován konvolucí píků oxidických skupin, výška DPV píku pro totožné koncentrace analytu zohledňuje rozdíly v kinetice včetně integrace druhého kroku reakce. Potenciál vrcholu DPV píku se shoduje s $E_{p/2}$ cyklické voltametrie. Deformace píku DPV na GCox elektrodě (obr. 4.18 D) lze přičíst přítomnosti vysoké povrchové koncentrace oxidických skupin vytvořených právě na GCox (viz obr. 4.15, křivka 4).



Obr. 4.18 Diferenční pulzní voltamogramy gallové kyseliny ($c = 6,5 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) na Au (A), HOPG (B), GC (C) a CGox (D) při rychlosti vkládání potenciálu 50 mV s^{-1} , velikosti pulzu 25 mV a době pulzu 0,02 s.

Stabilita připraveného zásobního roztoku gallové kyseliny byla ověřena spektrofotometrickým měřením absorbance při λ_{MAX} po dobu 3 hodin v patnácti-minutových intervalech. Absorpční spektrum gallové kyseliny se dvěma absorpčními maximy 215 nm (A) a 270 nm (B) je uvedeno na obr. 4.19 (1). Kinetické měření stability kávové kyseliny při zvolených vlnových délkách λ_{MAX} je uvedeno na obr. 4.19 (2).



Obr. 4.19 Absorpční spektrum kávové kyseliny ($c = 5,0 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) (1) a kinetické měření stability kávové kyseliny (2).

Katalytický vliv oxidických skupina na povrchu GCox elektrody je tedy velmi podobný v případě kávové a gallové kyseliny, což lze vysvětlit podobností jejich struktury a tedy i mechanismu zapojení do elektrochemické reakce. Katalytické skupiny v případě askorbové kyseliny urychlují její kinetiku (nejnižší hodnota přepětí $E_{p,A}$), ale pravděpodobně neovlivňují mechanismus elektrochemické reakce.

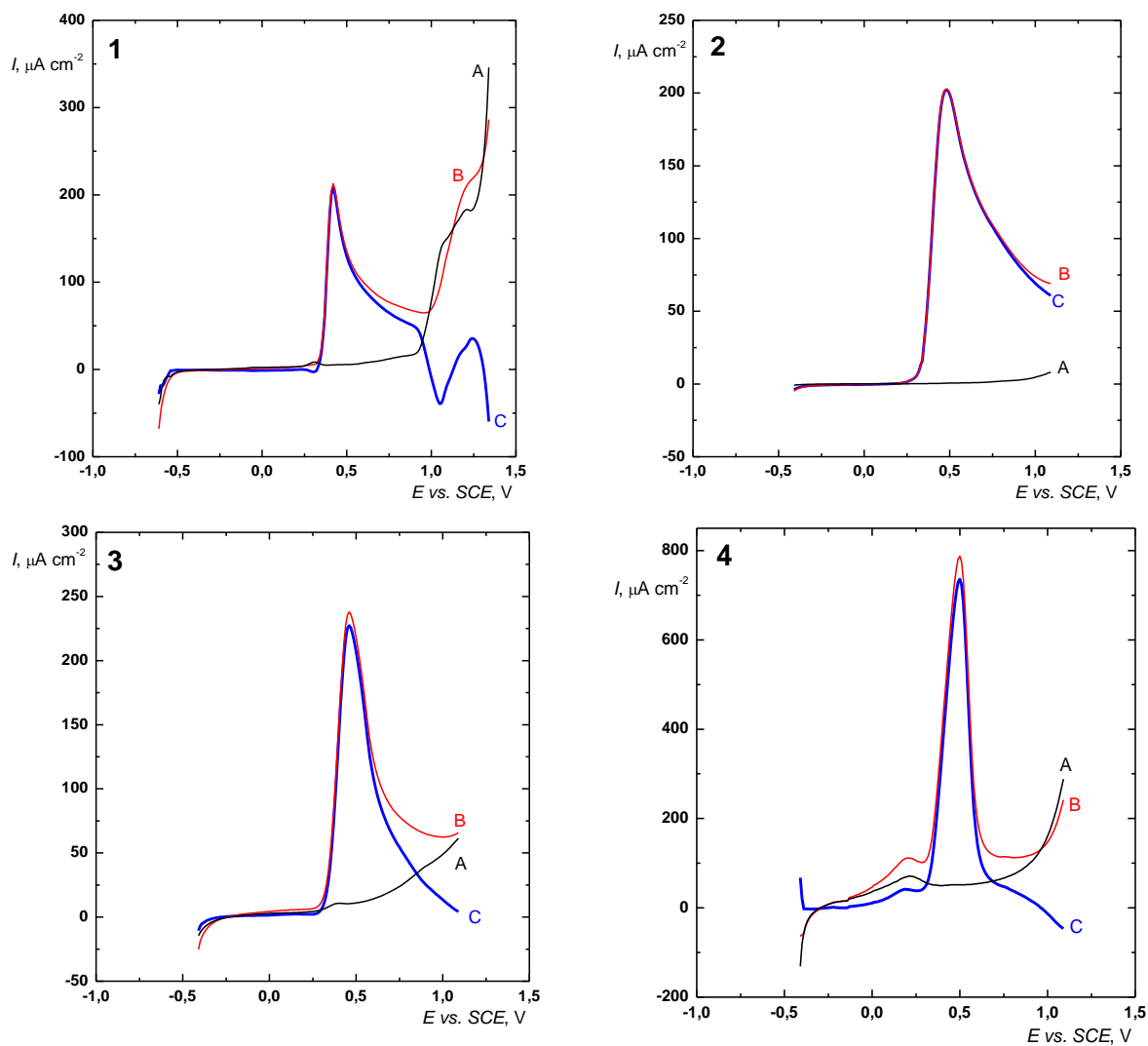
4.5 Zpracování dat

Tato část obsahuje postupy normalizace voltametrických křivek, vytváření souboru parametrů vhodných pro počítačové vyhodnocování a usnadňujících porovnávání a eliminaci jednotlivých složek analytu.

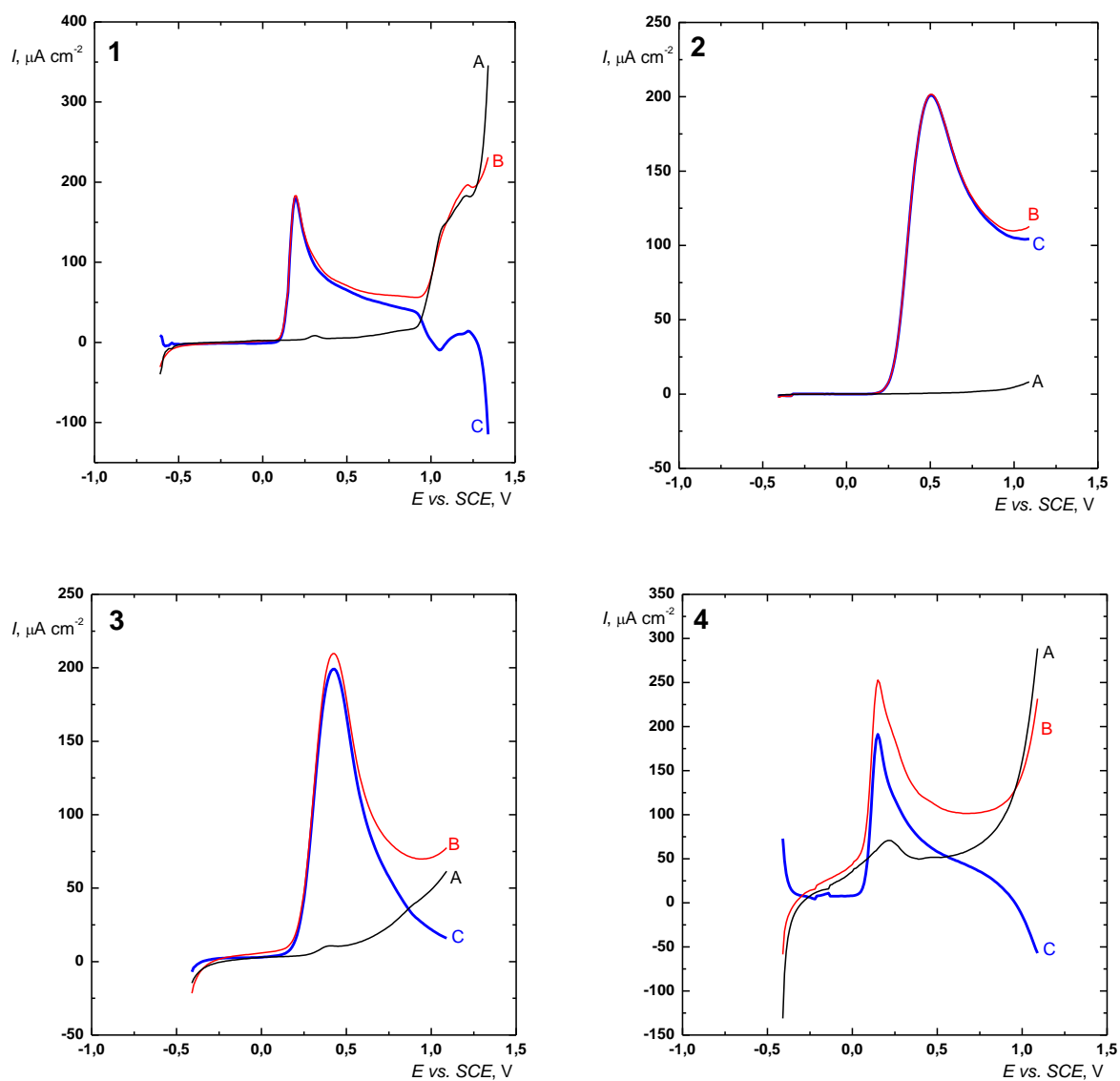
4.5.1 Normalizace na základní linii

První operací po získání souboru elektrochemických dat byla normalizace na základní linii, tedy eliminace vlivu zbytkových proudů, kdy je odečtena křivka základního elektrolytu na dané elektrodě (Au, HOPG, GC a GCox) od křivky analytu. Tím je eliminován vliv zbytkových proudů a získáme křivky, jejichž základní linie je posunuta na základní linii, což zjednodušuje odečet proudové odezvy a vzájemné porovnání voltametrických křivek získaných na rozdílných elektrodových materiálech. Pro ilustraci je tato operace ukázána na anodických částech naměřených cyklických voltamogramů na všech zde použitých elektrodových materiálech (obr. 4.20 – 4.22).

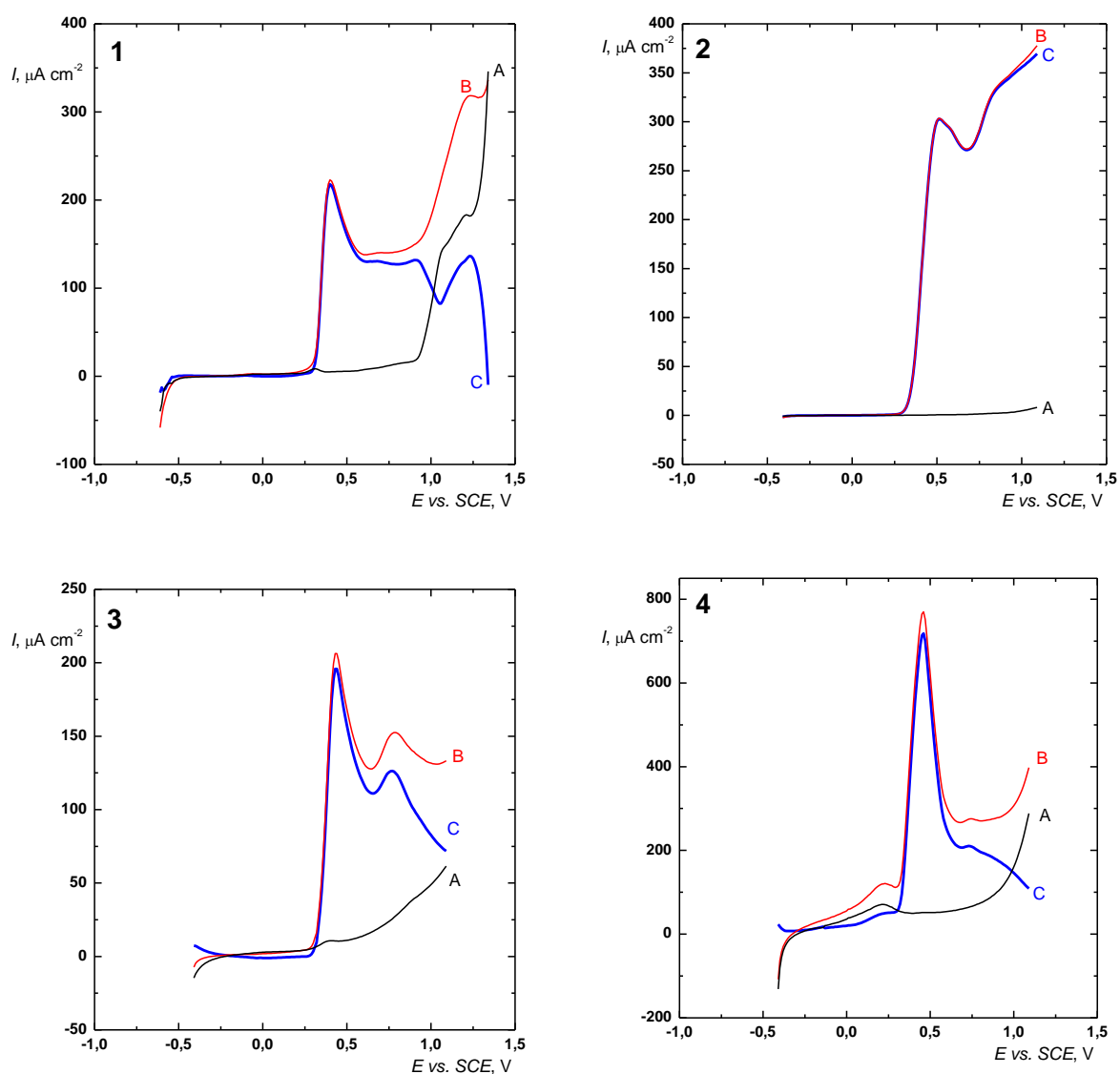
Křivka A znázorňuje anodickou část cyklického voltamogramu základního elektrolytu na dané elektrodě, B odpovídá analytu před odečtením základního elektrolytu a C je výsledná křivka, která byla získána odečtením křivky A od křivky B. Za povšimnutí stojí křivka C na obr. 4.20 (1), tedy kávová kyselina na Au elektrodě, kde dochází k inverzi části rozdílového oxidačního proudu díky navýšení proudů oxidů doznívající oxidace kávové kyseliny. Pro automatické zpracování dat je možno tyto případy řešit např. předřazením dekonvoluce. K inverzi části rozdílového oxidačního proudu dochází i v případě askorbové a gallové kyseliny (obr. 4.21 (1) a 4.22 (1) křivka C). Jak je patrné z obr. 4.20 – 4.22 však ve všech případech normalizace na základní linii úspěšně eliminovala proudy odpovídající elektrochemické reakci materiálu elektrody. Nejzřetelnější je eliminace zbytkových proudů na GCox (obr. 4.20 – 4.22 (4) křivka C), kde zbytkové proudy dosahují nejvyšších hodnot.



Obr. 4.20 Ukázka normalizování voltamogramů kávové kyseliny ($c = 6,5 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) na Au (1), HOPG (2), GC (3) a GCox (4). Kde (A) je základní elektrolyt, (B) voltamogram kávové kyseliny bez odečteného základního elektrolytu a (C) po odečtení základního elektrolytu.



Obr. 4.21 Ukázka normalizování voltamogramů askorbové kyseliny ($c = 6,5 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) na Au (1), HOPG (2), GC (3) a GCox (4). Kde (A) je základní elektrolyt, (B) voltamogram askorbové kyseliny bez odečteného základního elektrolytu a (C) po odečtení základního elektrolytu.



Obr. 4.22 Ukázka normalizování voltamogramů gallové kyseliny ($c = 6,5 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) na Au (1), HOPG (2), GC (3) a GCox (4). Kde (A) je křivka základního elektrolytu, (B) voltamogram gallové kyseliny bez odečteného základního elektrolytu a (C) po odečtení základního elektrolytu.

4.5.2 Sloupcové grafy parametrů

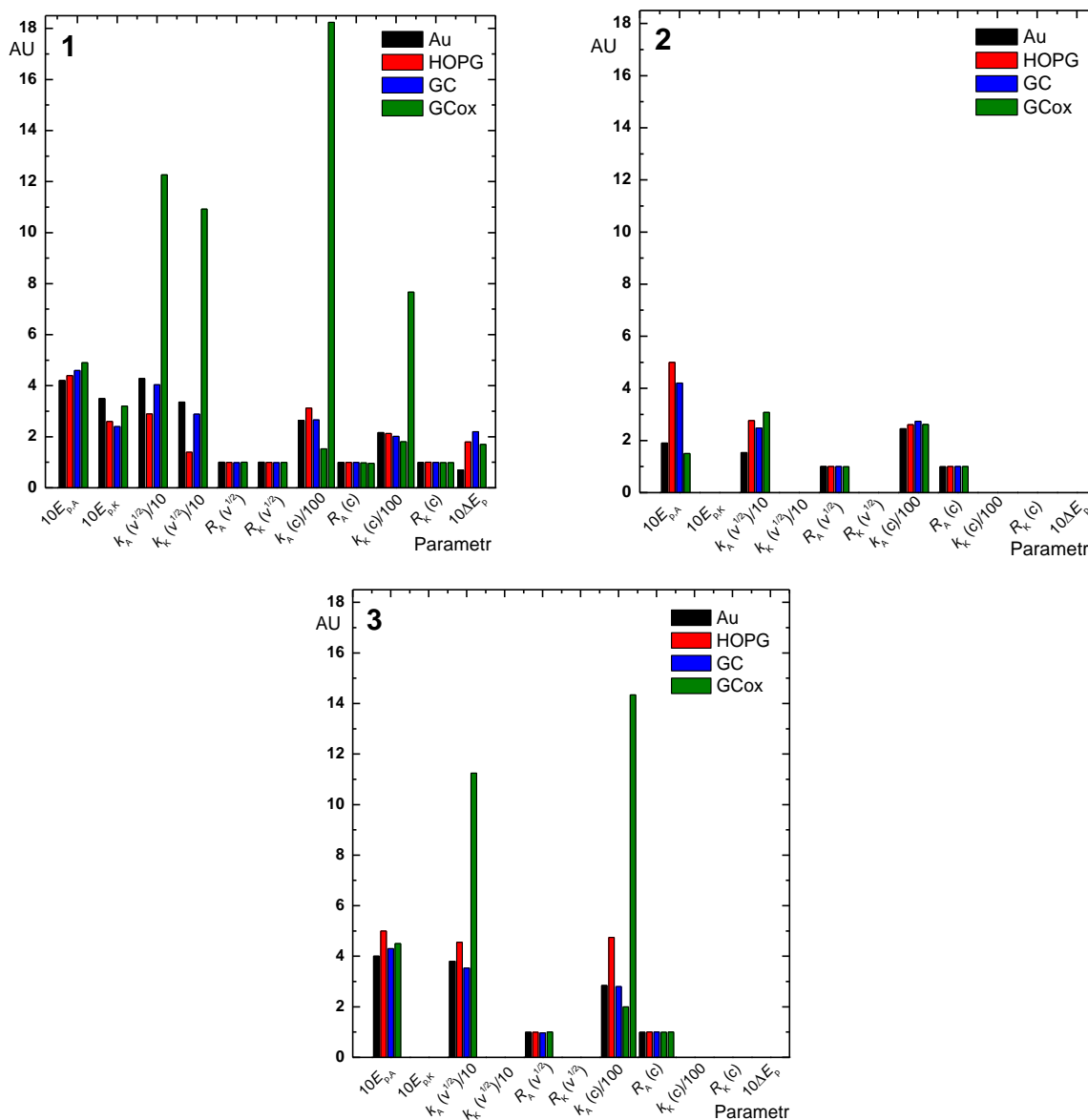
Kombinací parametrů získaných z voltametrických dat na různých elektrodách lze získat parametrické vyjádření elektrochemických vlastností analytu, jež je v závislosti na počtu elektrod a použitých parametrů, pro danou látku do značné míry charakteristické. Zde hodnoty jednotlivých parametrů představují mediány (pro $n = 3$) z opakovaného měření. Tyto grafy získané sloučením elektrochemických parametrů analytu na všech elektrodách jsou, podobně jako spektrum, které připomínají, do jisté míry specifickou charakteristikou daného analytu. Pro tvorbu těchto parametrických grafů byla použita jednak data ze základní databáze, tak i data získaná analytickým zpracováním základního souboru. Pro vytvoření těchto kumulovaných grafů je nutné buď upravit parametry násobením fixním koeficientem, tj. totožným pro parametry získané pro všechny analyty na všech použitých elektrodách (tak tomu bylo v této práci), nebo použít vícenásobných os s různými, avšak pro daný parametr pevně fixovanými měřítky, aby bylo možné jejich paralelní zobrazení i vzájemné porovnávání. Fixní koeficienty jsou uvedeny u každého parametru v daném grafu. Výhodou parametrických kumulovaných souborů je relativní jednoduchost počítačových fitovacích procedur použitelných při identifikaci analytu.

Primárními parametry byly zvoleny $E_{p,A}$ a $E_{p,K}$ (vynásobeny koeficientem 10), a sekundárními směrnice kalibračních závislostí $I_{p,A} \sim c[k_A(c)]$ a $I_{p,K} \sim c[k_K(c)]$ (poděleny koeficientem 100), společně se svými korelačními koeficienty. Směrnice odpovídají citlivosti zvolené elektrochemické metody na daném elektrodovém materiálu vůči analyzované složce. Korelační koeficienty určují míru vzájemné statistické lineární závislosti dvou proměnných [74]. Tyto parametry byly získány během tvorby analytických parametrů ze základního souboru dat, tedy lineární regrese kalibračních závislostí.

Další sekundární parametry jsou směrnice z rychlostních závislostí $I_p(v^{1/2})$ [ozn. $k_A(v^{1/2})$ a $k_K(v^{1/2})$] (poděleny koeficientem 10), tedy ze závislostí I_p vs. $v^{1/2}$, společně se svými korelačními koeficienty [ozn. $R_A(v^{1/2})$ a $R_K(v^{1/2})$] a rozdíl $E_{p,A} - E_{p,K} = \Delta E_p$ (vynásoben koeficientem 10), který lze využít pro výpočet počtu elektronů účastnících se elektrodového děje. Primární i sekundární parametry zobrazené na obr 4.23 (1 – 3) byly z důvodu zobrazení v jednom sloupcovém grafu (bez nutnosti

různých měřítek osy Y) poděleny nebo vynásobeny vhodným koeficientem, který je uveden u příslušného parametru v grafu.

Na obr. 4.23 jsou uvedeny sloupkové grafy parametrů získaných zpracováním základního souboru dat pro jednotlivé komponenty, tj. pro kávovou (1), askorbovou (2) a gallovou kyselinu (3) na použitých elektrodách. Z těchto grafů, komponovaných do souborů připomínajících spektrální charakteristiku, jsou na první pohled patrné rozdíly v elektrochemickém chování analytů na jednotlivých elektrodách charakteristické pro danou komponentu.



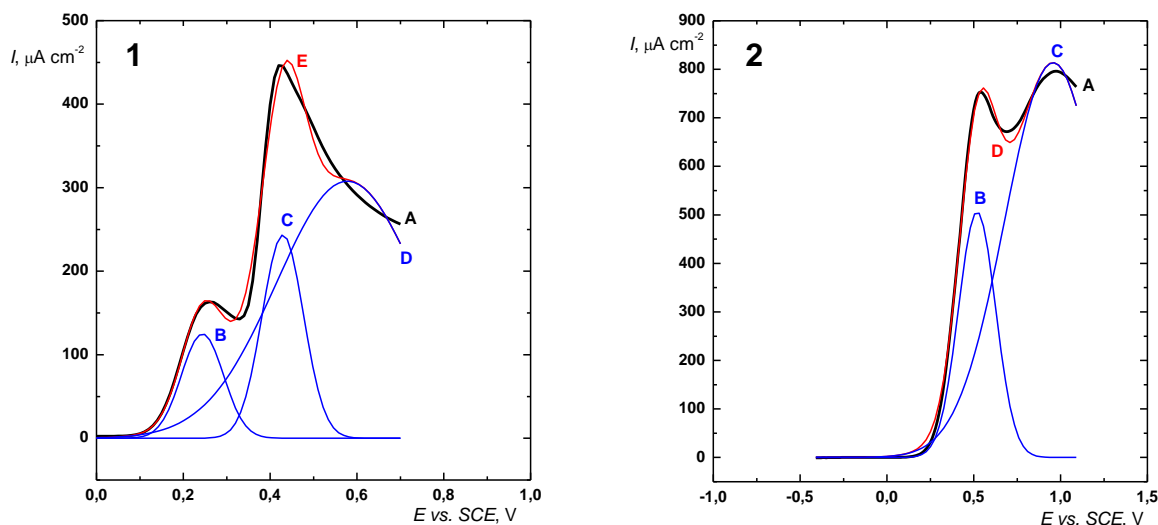
Obr. 4.23 Sloupkové grafy parametrů s uvedenými fixními koeficienty pro kávovou kyselinu (1), askorbovou kyselinu (2) a gallovou kyselinu (3) na zvolených elektrodách (Au, HOPG, GC a GCox).

Rozdíly jsou patrné především u kávové a gallové kyseliny (obr. 4.23 (1 a 3)) na GCox elektrodě. Elektrochemická reverzibilita kávové kyseliny poskytuje parametry, které nejsou přítomny u elektrochemicky ireverzibilních analytů. Tyto postupy lze např. dobře uplatnit již při identifikaci analytů na výstupu z dělicích kolon, kdy porovnáním s databází těchto souborů grafů bude možné, podobně jako porovnáním spektra s databází spekter, určit o jaký analyt se jedná. Se vzrůstajícím počtem parametrů se zvyšuje i pravděpodobnost správného určení analytu. V případech na obr. 4.23 (1-3) by pro určení daného analytu stačila hodnota $E_{p,A}$ nebo $E_{p,K}$, jelikož je zřejmý rozdíl těchto hodnot pro jednotlivé kyseliny.

4.5.3 Směsný analyt a matematická dekonvoluce jednotlivých komponent

Matematická dekonvoluce voltametrických křivek směsných analytů Gaussovou aproximací byla provedena v programu Origin v. 6.1. Z analytického hlediska má tato operace význam v případě překrývajících se signálů [13, 23, 25], kdy lze z křivky směsného analytu oddělit její jednotlivé komponenty, jak je ukázáno na obr. 4.24 pro Au (1), HOPG (2) a na obr. 4.25 pro GC (1) a GCox (2). Křivka A (černá) znázorňuje směsný analyt, červené křivky (D, E) odpovídají Gaussově aproximaci křivky A, modré křivky byly získány dekonvolucí.

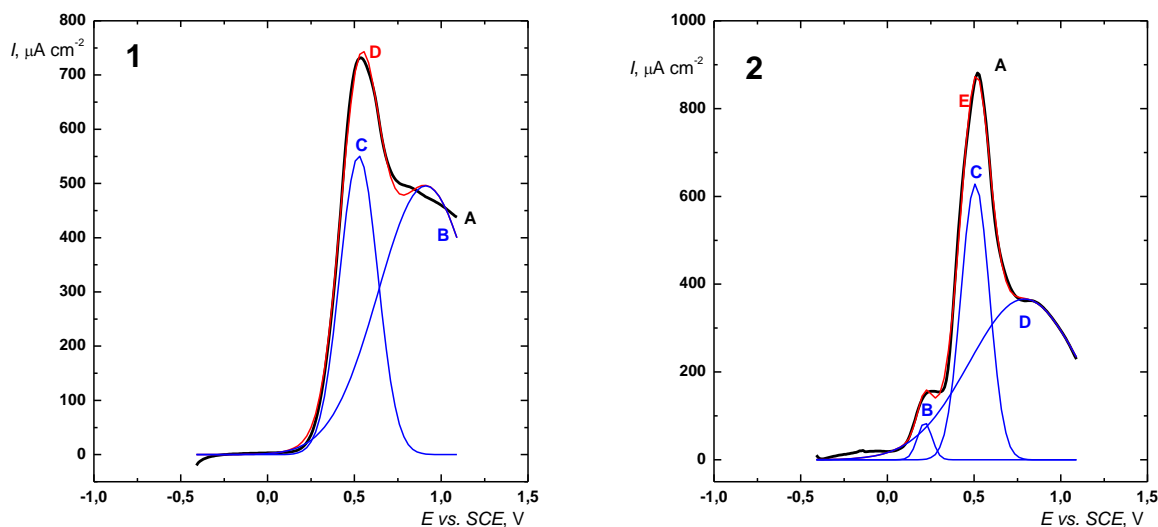
Dekonvolucí získané křivky směsného analytu na Au – obr. 4.24 (1) odpovídají askorbové kyselině (křivka B), křivka C je společná pro kávovou a gallovou kyselinu, křivka D indikuje pravděpodobně tvorbu Au oxidů, zatímco na HOPG obr 4.24 (2) křivka B odpovídá společnému oxidačnímu kroku všech komponent a křivka C druhému jednoelektronovému oxidačnímu kroku gallové kyseliny.



Obr. 4.24 Anodická část voltametrické křivky ekvimolární ($c = 6,5 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) směsi askorbové, kávové a gallové kyseliny (A) na Au (1) a HOPG (2). B, C, D (obr. 1) a B, C (obr. 2) jsou křivky získané dekonvolucí (A) Gaussovou aproximací. Křivka E obr. 1 a D obr. 2 odpovídá Gaussově aproximaci. Dekonvoluci získané oxidační píky odpovídají (1): B: askorbová kyselina, C: směsný pík oxidace kávové a gallové kyseliny a D pík odpovídající pravděpodobně tvorbě Au oxidů. (2): B je směsný pík oxidace kávové, askorbové a gallové kyseliny, C pík druhého kroku elektrochemické oxidace gallové kyseliny.

Dekonvolucí voltamogramu na GC elektrodě (obr. 4.25 (1)) získaná křivka C odpovídá společnému oxidačnímu kroku všech komponent na této elektrodě, zatímco křivka B druhému kroku oxidace gallové kyseliny.

Na GCox (obr. 4.25 (2)) byly dekonvolucí získány křivky (B, C a D). Křivka B znázorňuje oxidaci askorbové kyseliny, křivka C je evidentně společná oxidace kávové a gallové kyseliny, křivka D pravděpodobně zahrnuje nárůst oxidačního proudu na konci potenciálového okna GCox (viz obr. 4.1 (4)).



Obr. 4.25 Anodická část voltametrické křivky ekvimolární ($c = 6,5 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) směsi kyselin kávové, askorbové a gallové A na GC (1) a GCox (2). B a C jsou křivky získané po dekonvoluci křivky A, která byla získána Gaussovou aproximací (D na obr. 1 a E na obr. 2).

Dekonvoluci získané oxidační píky odpovídají (1): C směsný pík oxidace kávové, gallové a askorbové kyseliny, C: druhému kroku oxidace gallové kyseliny. (2): (B) je oxidační pík askorbové kyseliny, C směsný pík oxidace kávové gallové kyseliny, D pík odpovídající pravděpodobně nárůstu oxidačního proudu na konci potenciálového okna na GCox.

Využitím matematické dekonvoluce Gaussovou aproximací lze i přes vzájemně překrývající se signály jednotlivých komponent směsného analytu, získat křivky odpovídající jednotlivým složkám.

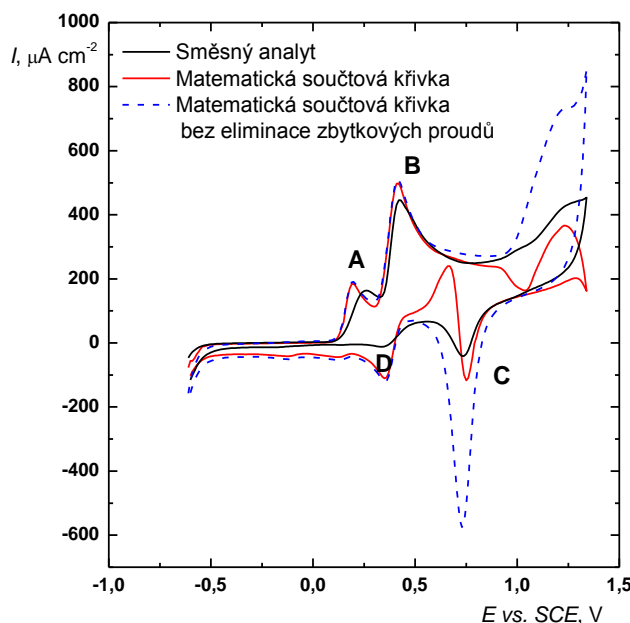
4.5.4 Modelová voltametrická křivka směsného analytu

Porovnáním reálné (naměřené) voltametrické křivky s modelově vytvořenou součtovou křivkou jednotlivých komponent lze indikovat interakce jednotlivých komponent ve směsi, resp. kompetici těchto komponent a jejich (mezi)produktů v elektrodové reakci. Pro tyto účely bylo nutné získat soubor elektrochemických dat odpovídající ekvimolárnímu směsnému analytu ($c = 6,5 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) na jednotlivých elektrodách (obrázky 4.26 – 4.29, černá křivka).

Dalším krokem bylo vytvoření součtové křivky matematickým součtem voltametrických křivek jednotlivých komponent analytu použitím databáze jednotlivých

složek ($c = 6,5 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) po eliminaci zbytkových proudů každé elektrody. Tím byly získány cyklické voltamogramy představující matematicky vytvořenou křivku směsi analytů. (obr. 4.26 – 4.29, červené křivky). Matematicky vytvořený voltamogram směsi nezahrnuje fyzikálně chemické interakce mezi jednotlivými složkami směsného analytu. Pro zahrnutí všech variant interakcí jednotlivých komponent směsného analytu by bylo zapotřebí matematických modelů, aplikovaných do systému nejlépe s využitím programovaných neuronových sítí (ANN) [23, 24]. Na druhé straně však porovnání matematicky vytvořených voltamogramů s reálnými umožňuje detekci případné existence těchto interakcí. V tomto zjednodušeném provedení slouží porovnání matematických a experimentálních voltamogramů směsi analytů k indikaci odchylek od modelu, představujícího mezní případ neexistující interakce a kompetice mezi jednotlivými složkami směsného vzorku.

Na obr. 4.26 jsou zobrazeny cyklické voltamogramy odpovídající reálnému (černá křivka) a součtovému (červená křivka) směsnému analytu s eliminovanými zbytkovými proudy a bez eliminace těchto proudů (modrá křivka) na Au elektrodě. Na těchto voltamogramech si lze povšimnout čtyř píků (A, B, C, D), kde A odpovídá ireverzibilní oxidaci askorbové kyseliny, B je společný oxidační pík kávové a gallové kyseliny, C odpovídá zpětné redukci Au oxidů a D znázorňuje zpětnou redukci kávové kyseliny. Hodnota $E_{p,A}$ askorbové kyseliny je ve směsném analytu posunuta o asi 0,060 V pozitivněji oproti $E_{p,A}$ askorbové kyseliny z databáze voltamogramů ($E_{p,A} = 0,190 \text{ V}$). Posun $E_{p,A}$ askorbové kyseliny lze vysvětlit pravděpodobnou interakcí s kávovou kyselinou [35, 57], což ovlivňuje kinetiku elektrochemické reakce askorbové kyseliny.

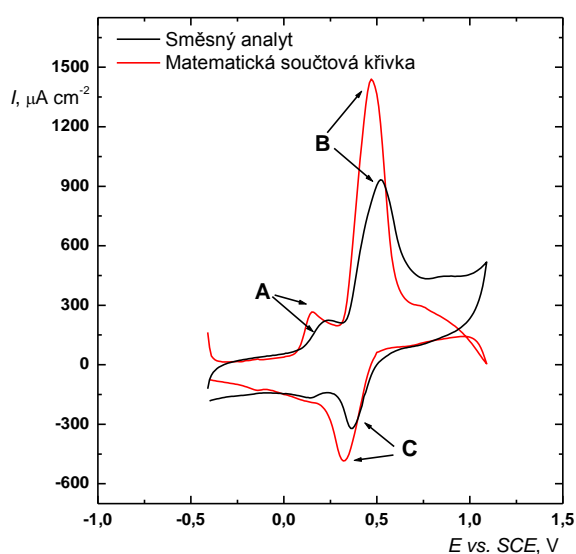


Obr. 4.26 Matematicky vytvořená součtová křivka s eliminovanými zbytkovými proudy (červená křivka) a bez eliminace zbytkových proudů (modrá křivka), reálný cyklický voltamogram směsného analytu (černá křivka) ($c = 6,5 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) na Au elektrodě při rychlosti vkládání potenciálu 50 mV s^{-1} . Kde pík **A** odpovídá askorbové kyselině **B** společnému píku kávové a gallové kyselině, **C** redukčnímu píku Au oxidů a **D** redukčnímu píku kávové kyseliny. Pík objevující se při potenciálu $E > 1 \text{ V}$ odpovídá tvorbě Au oxidů.

Na obr. 4.26 je nutno povšimnout si rozdílu v proudové odezvě odpovídající zpětné redukci Au oxidů (pík C), toto lze vysvětlit tím, že v rámci digitální směsi došlo k součtu proudové odezvy Au oxidů (pík C – modrá křivka) z jednotlivých cyklických voltamogramů. Červená barva znázorňuje matematickou součtovou křivku, u které byly eliminovány zbytkové proudy elektrodového materiálu. Na obr. 4.26 je patrný rozdíl ve velikosti redukčního píku kávové kyseliny (pík D). V případě součtového cyklického voltamogramu je zde dobře patrný pík, oproti tomu ve směsném analytu se tento pík D ztrácí. Potenciál redukce kávové kyseliny ve směsném analytu je posunut jen velmi málo asi o $0,015 \text{ V}$ negativněji v porovnání s $E_{p,K}$ čisté kávové kyseliny z databáze ($E_{p,K} = 0,350 \text{ V}$). Nicméně z literatury [35, 57] je známo, že dochází k vzájemné interakci kávové a askorbové kyseliny, která zabraňuje interakci karboxylových a hydroxylových skupin kávové kyseliny s povrchem elektrody. Ztrátu píku D lze vysvětlit přítomností oxidačních produktů askorbové kyseliny, resp. interakcí vzniklých oxidačních produktů askorbové a gallové kyseliny s oxidačním produktem kávové kyseliny.

Poněkud odlišný výsledek získáme i na GCox elektrodě (obr. 4.27). Důvodem je pravděpodobně posun v kinetice oxidační reakce složek analytu v důsledku přítomnosti katalytických oxidických skupin vytvořených na GCox.

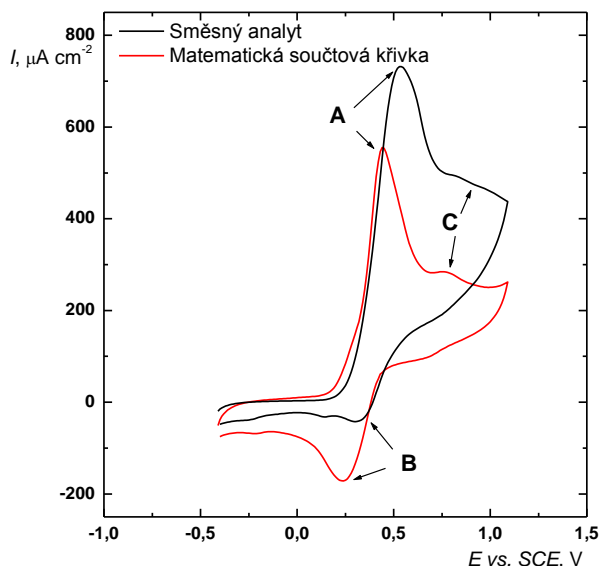
Oxidace askorbové kyseliny ($E_{p,A}$) probíhá ve směsném analytu cca o 0,100 V pozitivněji v porovnání s $E_{p,A}$ askorbové kyseliny z databáze voltametrických křivek ($E_{p,A} = 0,150$ V vs. SCE). Redukce kávové kyseliny ($E_{p,K}$) probíhá o 0,040 V pozitivněji v porovnání s $E_{p,K}$ kávové kyseliny z databáze voltametrických křivek ($E_{p,K} = 0,320$ V vs. SCE). Zde se uplatňuje pravděpodobně přítomnost katalytických oxidických skupin na kinetiku reakcí.



Obr. 4.27 Matematicky vytvořená součtová (červená) křivka a reálný cyklický voltamogram (černá křivka) ekvimolárního směsného analytu ($c = 6,5 \times 10^{-4}$ mol dm^{-3}) na GCox elektrodě při rychlosti ukládání potenciálu 50 mV s^{-1} . Kde pík A odpovídá askorbové kyselině, B společnému píku kávové a gallové kyseliny a pík C redukčnímu píku kávové kyseliny.

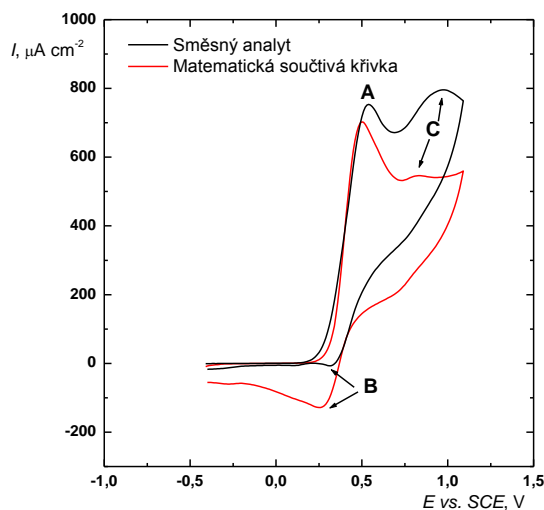
Na GC elektrodě (obr. 4.28) dochází ke splnutí oxidačních píků všech komponent, zatímco redukční pík kávové kyseliny je velmi dobře patrný. V anodické oblasti kolem 0,8 V vs. SCE je pravděpodobně patrný náznak druhého kroku oxidace.

K redukci kávové kyseliny dochází ve směsném analytu přibližně asi o 0,060 V pozitivněji oproti $E_{p,K}$ kávové kyseliny z databáze voltametrických křivek ($E_{p,K} = 0,240$ V). Posun $E_{p,K}$ kávové kyseliny lze vysvětlit interakcí oxidačních produktů askorbové kyseliny s kávovou kyselinou [35].



Obr. 4.28 Matematicky vytvořená součtová (červená) voltametrická křivka a reálný cyklický voltamogram (černá křivka) směsného ekvimolárního analytu ($c = 6,5 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) na GC elektrodě při rychlosti vkládání potenciálu 50 mV s^{-1} . Kde pík A odpovídá společnému oxidačnímu píku askorbové, kávové a gallové kyseliny a B odpovídá redukčnímu píku kávové kyseliny a pík C pravděpodobně druhému kroku dvouelektronové oxidace gallové kyseliny.

Relativně inertní elektroda tvořená bazální rovinou HOPG (obr. 4.29) poskytuje voltamogram podobný GC. Lze usuzovat, že přítomnost oxidických skupin na GCox i Au umožňuje rozlišení oxidačních reakcí jednotlivých komponent analytu. Zpětná redukce je však významně potlačena na všech elektrodách s výjimkou GCox.



Obr. 4.29 Matematicky vytvořená součtová (červená) křivka a reálný cyklický voltamogram směsného ekvimolárního analytu ($c = 6,5 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) na HOPG elektrodě při rychlosti vkládání potenciálu 50 mV s^{-1} . Kde pík A odpovídá společnému oxidačnímu píku askorbové, kávové a gallové kyseliny a B odpovídá redukčnímu píku kávové kyseliny a pík C pravděpodobně druhému kroku dvouelektronové oxidace gallové kyseliny.

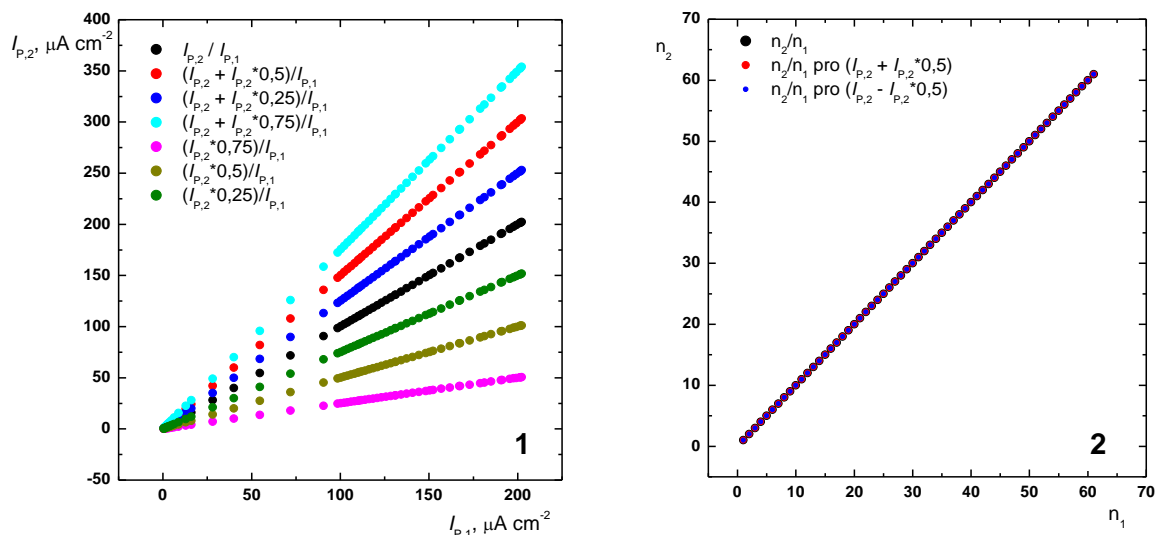
Protože matematicky vytvořené (součtové) voltametrické křivky směsného analytu vykazují na všech elektrodách přítomnost redukčního píku (kávové kyseliny) zatímco na reálných voltamogramech směsi je tento pík potlačen, lze usuzovat na interakci kávové kyseliny s některým z ostatních analytů, resp. na kompetitivní chování produktů oxidace na elektrodě.

4.6 Porovnávání voltametrických dat pomocí korelačních funkcí

Porovnávání voltametrických dat lze provádět ve zjednodušené formě porovnáváním vhodně zvolených parametrů resp. jejich skupin odvozených z těchto dat (metoda „fingerprint“, viz kap. 4.5.2). Výhodou tohoto přístupu je relativní jednoduchost komparačních procedur a tedy i rychlost zpracování. Další možností je proto porovnávání kompletních datových souborů, tedy celých voltametrických křivek např. vytvořením korelačních funkcí. Prostřednictvím korelační funkce lze vyjádřit vzájemnou podobnost dvou funkcí. Lineární průběh korelace vyjadřuje podobnost korelovaných dat, míru shodnosti dat lze vyjádřit hodnotou korelačního koeficientu.

4.6.1 Modelové chování korelační funkce při definované vzájemné odchylce souborů dat

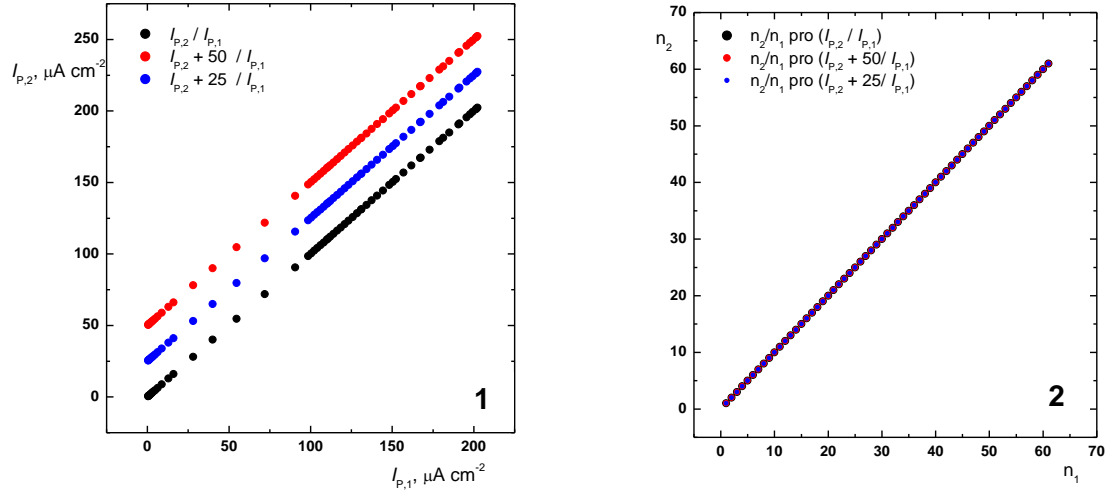
V této kapitole je ukázáno chování korelačních funkcí při modelových definovaných vzájemných posunech jinak identických datových souborů: Pro názornost a význam korelace byla provedena autokorelace jedné z naměřených voltametrických křivek. Byly vytvořeny dva soubory dat: Jeden ze souboru byl pozměněn a druhý byl ponechán nezměněn. Z těchto souborů byl vytvořen korelační graf. Na obr. 4.30 je zobrazena autokorelace proudových $I-E$ dat, kdy u jednoho ze souborů byly postupně změněny proudy o $\pm 25\%$, $\pm 50\%$ a $\pm 75\%$. Současně byla provedena i pořadová autokorelace těchto souborů dat (obr. 4.30 (2)).



Obr. 4.30 (1) Proudová autokorelace pro anodickou část cyklického voltamogramu, kdy původní hodnota proudu byla změněna o $\pm 25\%$, $\pm 50\%$ a $\pm 75\%$ ($I_{P,2}(E)$), druhý soubor ($I_{P,1}(E)$) byl ponechán nezměněn.

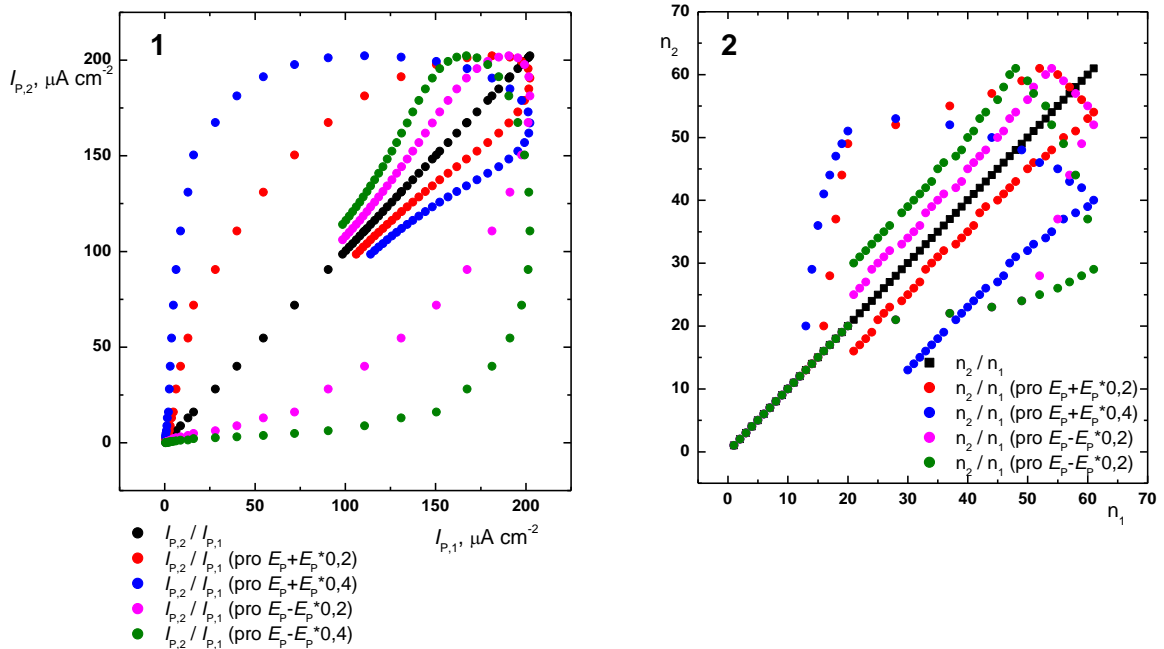
(2) Pořadová autokorelace stejného souboru proudových dat, kdy byl jeden soubor proudových dat ponechán nezměněn ($I_{P,1}(n_1)$), druhý soubor proudových dat ($I_{P,2}(n_2)$) byl zvětšen o $\pm 25\%$, $\pm 50\%$ a $\pm 75\%$.

Z obr. 4.30 (1) je patrné, že zvýšením hodnoty proudů u jednoho ze souborů dat o $\pm 25\%$, $\pm 50\%$ a $\pm 75\%$, získáme lineární korelační funkci a dojde pouze ke změně směrnice této závislosti, oproti pořadové korelaci kdy změna jednoho souboru dat nemá na výslednou korelaci vliv, neboť pořadí proudových dat v pořadové korelaci zůstává zachováno. Posunem hodnot proudů jednoho ze souborů dat v ose Y o konstanty $50 \mu\text{A cm}^{-2}$ a $25 \mu\text{A cm}^{-2}$ oproti druhému obr. 4.31 (1). V tomto případě je zachována směrnice lineární korelační funkce, dochází ale ke změně úseku na ose Y. Pořadová autokorelace zůstává nezměněná (obr. 4.31 (2)).



Obr. 4.31 Proudová autokorelace cyklického voltamogramu (1), kdy byl druhý soubor dat zvětšen o $50 \mu\text{A cm}^{-2}$ a $25 \mu\text{A cm}^{-2}$ v ose Y, (2) pořadová autokorelace stejného souboru dat kdy byl druhý soubor dat zvětšen o $50 \mu\text{A cm}^{-2}$ a $25 \mu\text{A cm}^{-2}$.

Ponecháme-li proudová data stejná, ale posuneme-li je v ose X (tedy v potenciálové ose) získáme velmi odlišné korelační funkce. Posunem druhého souboru dat o $\pm 20\%$ a $\pm 40\%$ E_p proti druhému a vynesení proti nezměněným původním proudovým hodnotám získáme korelační funkce na obr. 4.32.



Obr. 4.32 (1) Proudová autokorelace cyklického voltamogramu, kdy byl druhý soubor posunut o $\pm 20\%$, $\pm 40\%$ v ose X (tedy E_p) proti prvému, (2) pořadová autokorelace stejného souboru dat, kdy byl druhý soubor posunut o $\pm 20\%$, $\pm 40\%$ v ose X (tedy E_p) proti prvému.

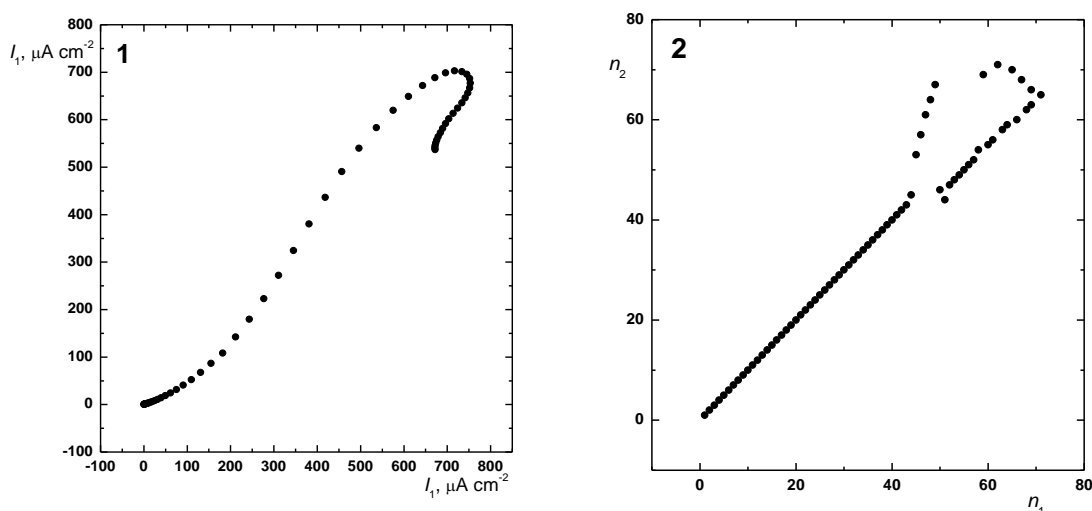
Z obr. 4.32 je patrné posuneme-li proudová data v ose X, tedy dojde k posunu potenciálu, dochází k delinearizaci korelační funkce. Tedy, pokud dochází k posunu E_p jednotlivých komponent v směsném analytu, bude výsledná korelace tohoto souboru dat vykazovat podobný průběh zobrazený na obr. 4.32 (1). Vzájemná korelace dvou voltametrických funkcí vyjadřuje specificky jejich vzájemnou podobnost, a z korelační funkce lze usuzovat na možné interakce v rámci reálného směsného analytu, oproti modelovým matematicky získaným voltametrickým křivkám kombinací jednotlivých komponent analytu.

4.6.2 Korelační funkce experimentálních souborů voltametrických dat

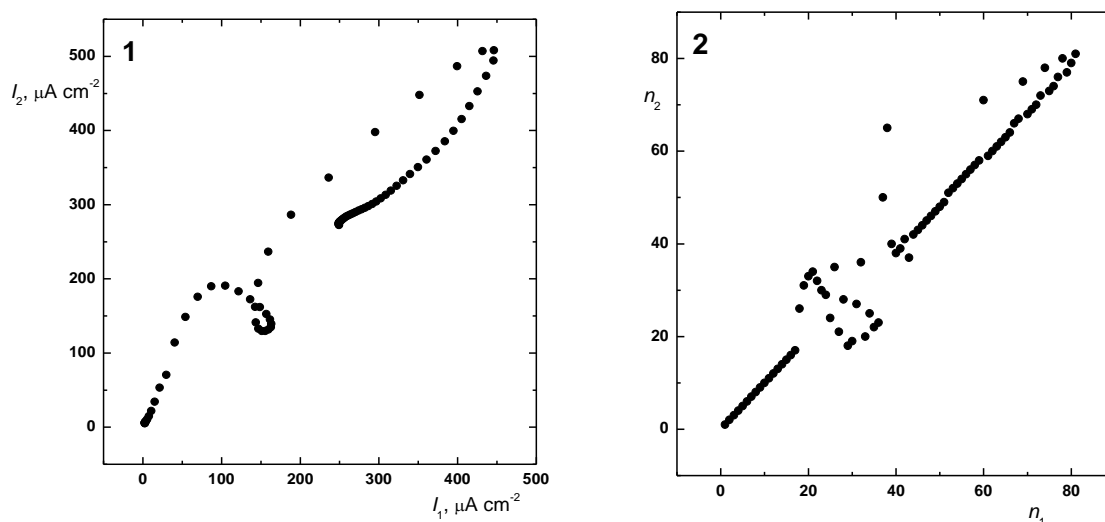
V této kapitole jsou uvedeny korelace voltametrických křivek experimentálních a křivek vzniklých matematickým sloučením resp. matematickou eliminací křivek jednotlivých analytů. Oba typy korelací jsou provedeny přímou korelací hodnot proudů (I_1 , I_2) experimentálních voltamogramů (index 1) a voltamogramů získaných matematickými postupy (index 2) z databáze voltametrických křivek resp. korelací pořadí těchto hodnot (n_1 , n_2).

4.6.2.1 Korelace experimentálních a matematickým sloučením vytvořených více-komponentních voltamogramů směsných analytů

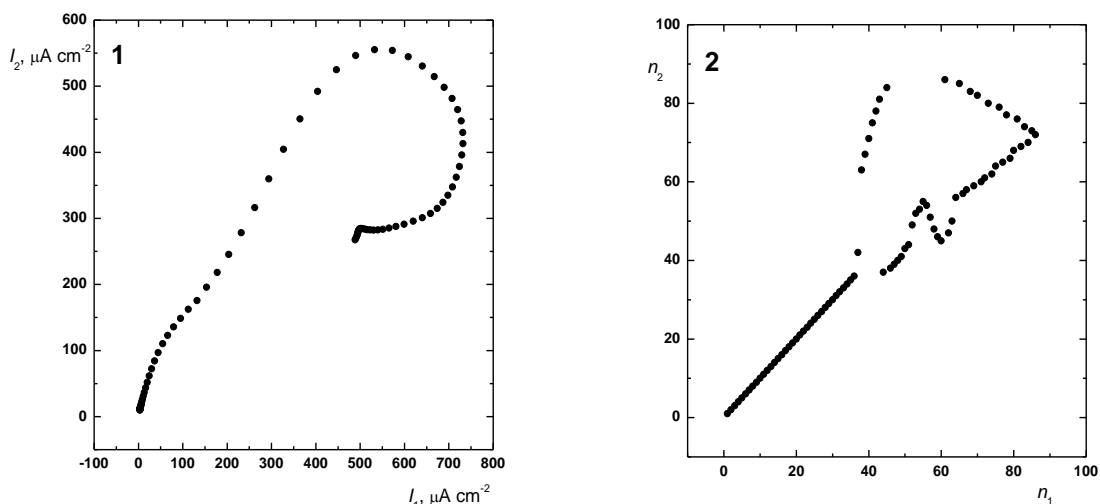
Voltametrické křivky použité v korelacích jsou zobrazeny na obr. 4.26 – 4.29. Tyto korelační funkce vyjadřují vzájemnou podobnost reálného voltamogramu směsného analytu se součtovým voltamogramem.



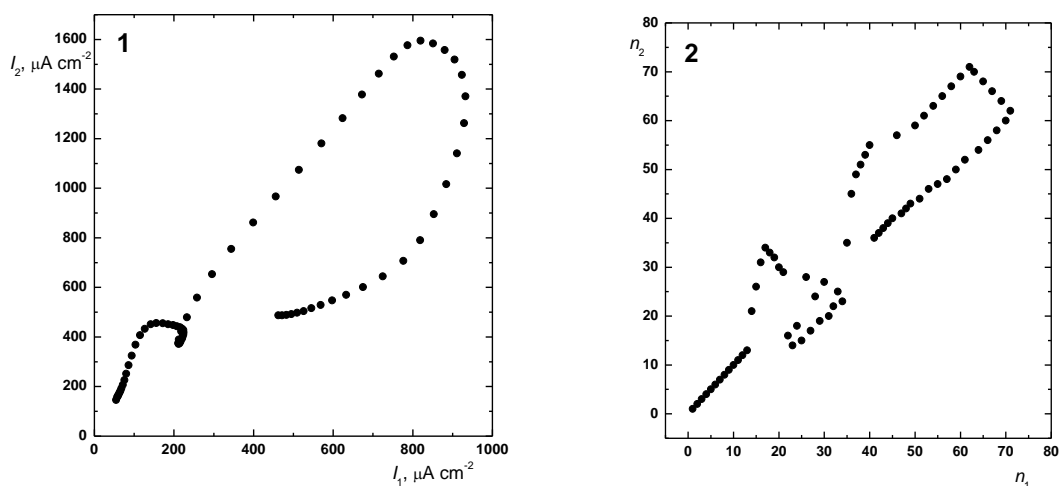
Obr. 4.33 Korelace proudové odezvy I_2 (součtového voltamogramu) vs. I_1 (reálný voltamogram směsného analytu) (1), pořadová korelace (2) n_2 (pořadí hodnot na součtové křivce) vs. n_1 (pořadí hodnot na reálném voltamogramu směsného analytu) na **HOPG** pro potenciálový rozsah $E = 0,0 - 0,7$ V.



Obr. 4.34 Korelace proudové odezvy I_2 (součtového voltamogramu) vs. I_1 (reálný voltamogram směsného analytu) (1), pořadová korelace (2) n_2 (pořadí hodnot na součtové křivce) vs. n_1 (pořadí hodnot v reálném voltamogramu směsného analytu) na **Au** elektrodě pro potenciálový rozsah $E = 0,0 - 0,8$ V.



Obr. 4.35 Korelace proudové odezvy I_2 (součtového voltamogramu) vs. I_1 (reálný voltamogram směsného analytu) (1), pořadová korelace (2) n_2 (pořadí hodnot na součtové křivce) vs. n_1 (pořadí hodnot v reálném voltamogramu směsného analytu) na **GC** elektrodě pro potenciálový rozsah $E = 0,0 - 0,85$ V.



Obr. 4.36 Korelace proudové odezvy I_2 (součtového voltamogramu) vs. I_1 (reálný voltamogram směsného analytu) (1) a pořadová korelace (2) n_2 (pořadí hodnot na součtové křivce) vs. n_1 (pořadí hodnot v reálném voltamogramu směsného analytu) na **GCox** elektrodě pro potenciálový rozsah $E = 0,0 - 0,7$ V.

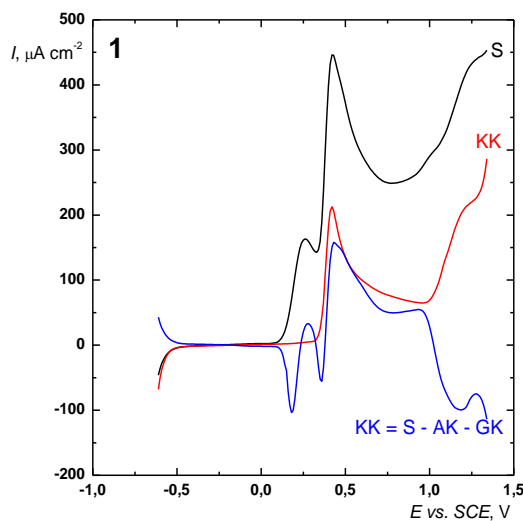
Z uvedených příkladů je vidět, že jednoduché korelace křivek směsného analytu poskytují zejména elektrody inertní (HOPG), resp. GC, které obě vykazují nízkou katalytickou aktivitu a jsou známy nízkou adsorpční afinitou. Korelace na zlaté elektrodě vykazuje také významnou část lineárních úseků, zatímco na GCox se

projevuje možnost blokování přítomných oxidických skupin pravděpodobně (mezi)produkty oxidace kyseliny kávové [35, 39].

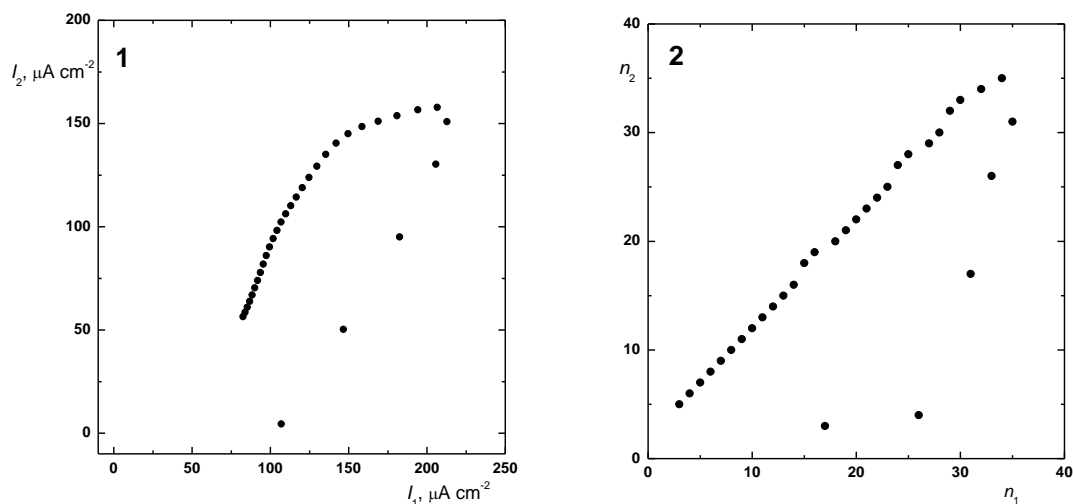
4.6.2.2 Korelace experimentálních a matematickou eliminací vytvořených voltametrických křivek jednotlivých analytů

Podobným způsobem postupujeme při korelaci experimentálních a matematickou eliminací vytvořených voltametrických křivek jednotlivých analytů, jak je ukázáno na několika následujících příkladech. Odečteme-li od směsného analytu, ve kterém je známá koncentrace jednotlivých komponent, jím odpovídající křivky naměřené individuálně (za stejných podmínek), měli bychom získat křivku zbývajících komponent. Křivka odpovídá křivce z databáze základních dat, za předpokladu, že v rámci směsného analytu nedocházelo k vzájemným interakcím. Na všech obrázcích modré křivky znázorňují matematickým odečtem získané křivky za použití databáze jednotlivých komponent (KK, AK a GK), kde KK je kávová kyselina, AK je askorbová kyselina a GK gallová kyselina, které byly naměřeny samostatně na daných elektrodových materiálech. Např. křivka kávové kyseliny byla získána odečtením křivky askorbové a gallové kyseliny od křivky směsného analytu (obr. 4.37). Analogicky byly získány voltametrické křivky odpovídající askorbové a gallové kyselině.

Korelace mezi voltametrickými křivkami jednotlivých komponent (z databáze) s křivkami získanými odečtením ostatních komponent od křivky směsného analytu, ukázala, že tato operace poskytuje velmi dobré výsledky na polykrystalickém Au (obr. 4.38 (1, 2)), kde získané korelační křivky mají jednoduchý průběh s významnými lineárními úseky. Relativně jednoduché korelační funkce poskytl i GC. Tyto korelace jsou ilustrovány na obr. 4.40, 4.44 a 4.48. Vzájemné korelace byly aplikovány pouze na významné části voltametrických křivek, tedy oblasti voltametrických píků. V oblasti kde výsledná korelace vykazuje lineární průběh, lze říci, že tyto dvě křivky vykazují dobrou shodu. V ostatních částech křivky je indikován posun v proměnných I a E .

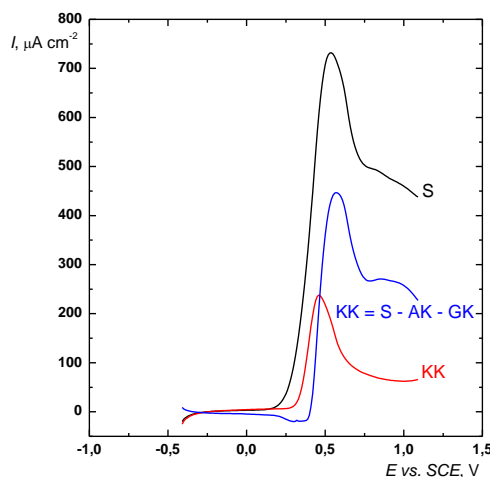


Obr. 4.37 Anodická část cyklického voltamogramu ekvimolárního ($6,5 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) směsného vzorku kyselin na Au. (S) je směsný vzorek kyselin, (KK) kávová kyselina a ($\text{KK} = \text{S} - \text{AK} - \text{GK}$) anodická část cyklického voltamogramu kávové kyseliny získaná matematickým odečtením křivky askorbové (AK) a gallové kyseliny (GK) od křivky směsného vzorku (S).

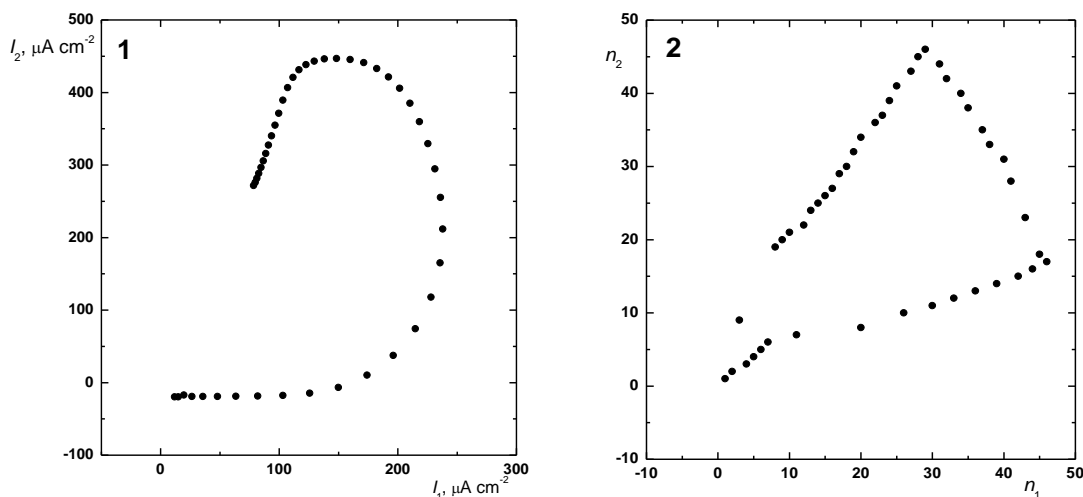


Obr. 4.38 Proudová (1) a pořadová (2) korelace mezi anodickou částí cyklických voltamogramů kávové kyseliny (KK) a matematicky získanou křivkou kávové kyseliny ($\text{KK} = \text{S} - \text{AK} - \text{GK}$) na Au elektrodě v potenciálovém rozsahu 0,38 – 0,7 V. Index 2 představuje matematicky získané hodnoty a dolní index 1 hodnoty odpovídající datům, která byla získána při chemickém měření.

V případě korelací (obr. 4.40) provedených s daty získanými na GC elektrodě (obr. 4.39), již výsledná korelační funkce vykazuje méně lineárních oblastí, tedy menší vzájemnou podobnost. Z průběhu korelačních funkcí lze usuzovat na možné interakce mezi jednotlivými složkami. Pořadová korelace také v některých případech poskytuje lepší výsledky než proudová korelace, jak je patrné např. na obr. 4.40 (2).



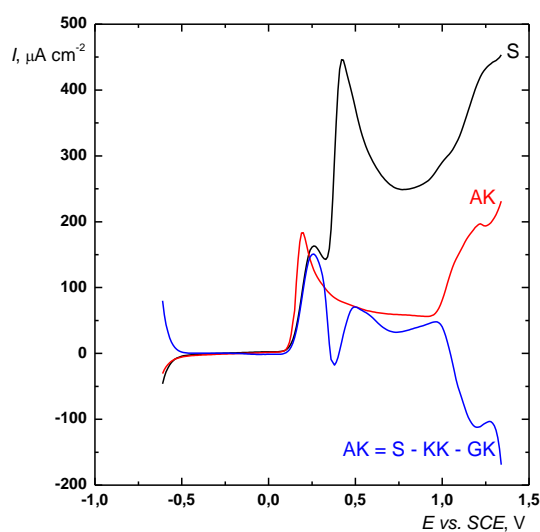
Obr. 4.39 Anodická část cyklického voltamgramu směsného ekvimolárního ($6,5 \times 10^{-4}$ mol dm $^{-3}$) vzorku kyselin na GC elektrodě. (S) je směsný vzorek kyselin, (KK) kávová kyselina a (**KK** = S – AK – GK) kávové kyselina získaná matematickým odečtením křivky askorbové (AK) a gallové kyseliny (GK) od křivky směsného vzorku (S).



Obr. 4.40 Proudová (1) a pořadová (2) korelace mezi anodickou částí cyklických voltamogramů kávové kyseliny (KK) a matematicky získanou křivkou kávové kyseliny (**KK** = S – AK – GK) na GC elektrodě v potenciálovém rozsahu 0,3 – 0,75V. Index 2 představuje matematicky získané hodnoty a dolní index 1 hodnoty odpovídající datům, která byla získána při chemickém měření.

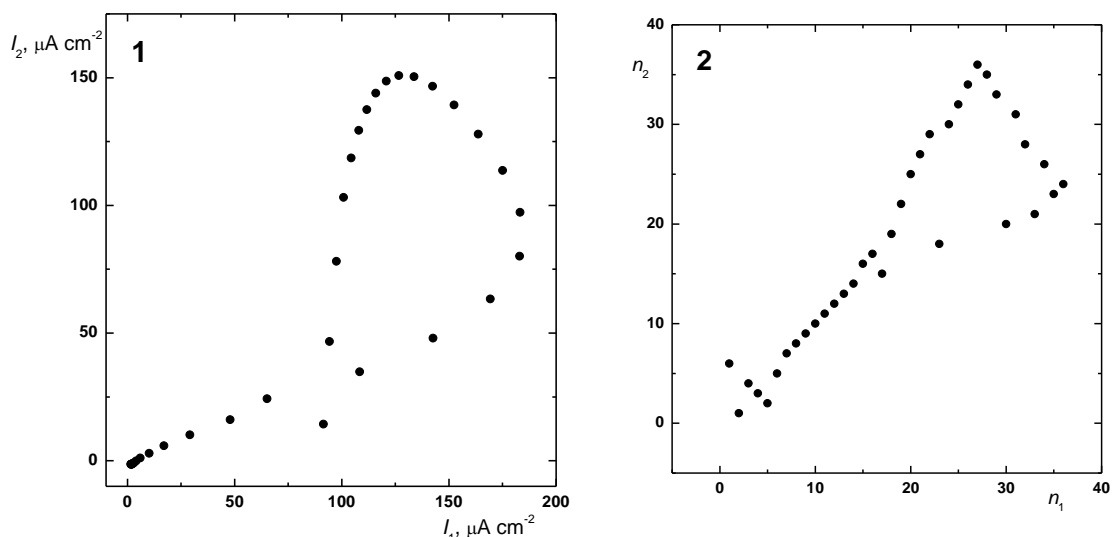
Nekonzistentní velikost píku kávové kyseliny získané po odečtu a naměřené (z databáze) (obr. 4.39) může být způsobena posunem E_p jednotlivých složek v rámci směsi. Toto se projevuje jednak negativními píky přítomnými na matematických dekonvolucích, ale i rozdíly ve velikosti I_p z databáze a matematickou konvolucí získanou křivkou. Způsobené tím, že E_p individuálních složek jsou rozdílné od E_p jednotlivých složek ve směsném analytu, díky vzájemným interakcím. Matematická dekonvoluce nepostihuje interakce mezi jednotlivými složkami.

Rovněž v tomto případě jsou však získány relativně jednoduché korelační křivky naznačující významnou míru podobnosti voltametrických křivek získaných matematickou eliminací a experimentálně získané křivky analytu.



Obr. 4.41 Anodická část cyklického voltamgramu ekvimolárního ($6,5 \times 10^{-4}$ mol dm $^{-3}$) směsného vzorku kyselin na **Au**. (S) je směsný vzorek kyselin, (AK) askorbová kyselina a (**AK** = S – KK – GK) anodická část cyklického voltamogramu askorbové kyseliny získaná matematickým odečtením křivky kávové (KK) a gallové kyseliny (GK) od křivky směsného vzorku (S).

Na zlaté elektrodě je patrná velmi dobrá shoda anodického píku KK (obr. 4.37) resp. AK (obr. 4.41) získaného matematickou eliminací s voltametrickou křivkou z databáze, jak potvrzují korelační funkce (obr. 4.38 a 4.42) v oblastech svého lineárního průběhu. Zatímco lineární úseky odrážejí pouze posun v proudové ose, z nelineárních úseků korelačních funkcí lze usuzovat na možné interakce mezi jednotlivými složkami (tedy posun E proměnné).



Obr. 4.42 Proudová (1) a pořadová (2) korelace mezi anodickou částí cyklických voltamogramů askorbové kyseliny (AK) a matematicky získanou křivkou askorbové kyseliny ($\mathbf{AK} = \mathbf{S} - \mathbf{KK} - \mathbf{GK}$) na Au elektrodě v potenciálovém rozsahu 0,0 – 0,35 V. Index 2 představuje matematicky získané hodnoty a dolní index 1 hodnoty odpovídající datům, která byla získána při chemickém měření.

Rovněž v případě na obr. 4.42 jsou získány relativně jednoduché korelační křivky naznačující v lineárních úsecích významnou míru podobnosti voltametrických křivek získaných matematickou eliminací a reálné křivky analytu.

Lze tedy shrnout, že vyhodnocování elektrochemických dat je možné automatizovat vytvořením jediné korelační funkce ze dvou i více souborů elektrochemických dat. Průběh korelace pak umožňuje automatické porovnávání a rozhodování zda experimentální datové soubory odpovídají souborům uloženým v databázi. Přitom lze využít jednodušších softwarových rozlišovacích procedur (pattern recognition) pro identifikaci poměrně komplikovaných elektrochemických dějů.

5 ZÁVĚR

V této diplomové práci je prezentováno zpracování elektrochemických dat skupiny analytů získaných na modelovém souboru 4 elektrod s nesespecifickou odezvou (Au, HOPG, GC a GCox). Komponenty směsi analytů, na kterých byl tento přístup ukázán (gallová, askorbová a kávová kyselina) byly zvoleny jako složky modelového systému simulující potravinový vzorek. Mimo to, elektrochemické chování kávové, askorbové a gallové kyseliny na některých elektrodových materiálech nebylo dosud v literatuře popsáno: konkrétně KK, GK na GCox, KK, AK, GK na HOPG a GK na polykrystalickém Au.

Pro účel této práce byla vytvořena databáze elektrochemických dat analytů na jednotlivých elektrodách, která poskytla dobrý přehled o elektrochemickém chování analytů na rozdílných elektrodových materiálech. V případě kávové a gallové kyseliny byl nalezen vliv oxidických skupin přítomných na povrchu GCox na kinetiku elektrodové reakce.

Při práci s databází voltametrických dat bylo přihlíženo k výběru postupů rovněž z hlediska jejich vhodnosti pro případné budoucí automatické zpracování.

Databáze byla využita pro vytvoření modelových voltametrických křivek směsi analytů matematickým sloučením voltamogramů jednotlivých komponent. Takto získané voltamogramy nezahrnují vzájemné interakce jednotlivých složek a jejich porovnáváním s experimentálními voltamogramy směsných analytů na jednotlivých elektrodách lze tyto interakce identifikovat způsobem vhodným i pro použití v automatickém zpracování dat. Na základě těchto rozdílů byly nalezeny interakce mezi jednotlivými komponentami směsného analytu.

Z voltametrických křivek směsi analytů byly rovněž provedeny matematické eliminace jednotlivých komponent, a tím izolovány křivky zbývajících komponent na jednotlivých elektrodách umožňující jejich další identifikaci. K porovnání vzniklých

voltametrických křivek jednotlivých analytů s voltamogramy analytů obsaženými v databázi bylo použito korelačních funkcí.

Jednoduché korelace křivek směsného analytu poskytují zejména elektrody inertní (HOPG), které vykazují nízkou katalytickou aktivitu a jsou známy i nízkou adsorpční afinitou. Korelace na zlaté elektrodě vykazuje také významnou část lineárních úseků, zatímco na GCox se projevuje možnost blokování přítomných oxidických skupin pravděpodobně (mezi)produkty oxidace kávové kyseliny.

Ukázalo se, že relativně jednoduché komparativní techniky kombinované s matematickou dekonvolucí mohou indikovat interakce mezi analyty. Uvedený modelový přístup k řešení úlohy byl zjednodušen jak počtem typů použitých elektrod, což ve svém důsledku zhoršilo selektivitu získaného (poměrně malého) souboru dat, tak skutečností, že byly používány známé (ekvimolární) koncentrace analytů. Při větším počtu elektrod však lze očekávat zvýšení specifčnosti parametrických souborů v relaci s nárůstem počtu rozlišitelných kombinací hodnot parametrů získaných na jednotlivých elektrodách. Ve spojení s databází tak vzniká možnost skutečné identifikace jednotlivého analytu.

Z elektrochemických parametrů získaných z voltametrických dat byly rovněž vytvořeny soubory parametrů znázorněné v práci sloupcovými grafy. Tyto soubory kombinující elektrochemické parametry reakce analytu na více elektrodách vykazují významnou specifčnost vzhledem k danému analytu a umožňují jeho rozlišení ve skupině jiných látek. Podobně jako spektrální data umožní použití jednodušších srovnávacích procedur v automatickém zpracování.

Tento postup se ukázal být velmi vhodný pro identifikaci analytu po předchozím dělicím procesu – tedy zejména na výstupu separačních technik. Méně vhodný je však k identifikaci určitého analytu ve směsi jiných látek. Zde se osvědčuje spíše již zmíněná práce zahrnující porovnávání voltametrických křivek s křivkami jednotlivých komponent v databázi, matematicky vytvořených kompozitních křivek směsí analytů, jejich korelace s experimentálními křivkami, resp. po předchozí matematické eliminaci ostatních komponent. Korelace však mohou být – zvláště u směsí analytů – poměrně komplikované. Jejich zjednodušení lze dosáhnout předřazením matematické dekonvoluce.

Lze shrnout, že korelace a jednoduché matematické operace prováděné mezi křivkami směsného analytu a jeho jednotlivými komponentami mohou nalézt použití při identifikaci analytů zejména v případech, kdy nedochází k vzájemným interakcím komponent, i když v řadě případů umožní tyto interakce identifikovat. Bez větších problémů je možné uplatnit tuto techniku při identifikaci jednotlivých složek např. při analýze výstupu kapalně fáze po předchozím separačním procesu

Pro případnou aplikaci výpočetní techniky je komparace pomocí korelačních křivek výhodná, neboť lze využít postupného fitování na maximální dosažitelnou linearitu korelační funkce. Podobného přístupu lze použít pro zpracování jakýchkoliv souborů dat pocházejících z více nezávislých zdrojů.

Tato práce může posloužit jako součást podkladů pro vývoj senzorových polí typu „elektronický jazyk“.

LITERATURA

- [1] del Valle, M.: Sensor Arrays and Electronic Tongue Systems. *International Journal of Electrochemistry* **2012**, 1–11 (2012).
- [2] Vlasov, Y.; Legin, A.; Rudnitskaya, A.; di Natale, C.; D'Amico, A.: Nonspecific sensor arrays („electronic tongue“) for chemical analysis of liquids. *Pure and Applied Chemistry* **77**. 1965–1983 (2005).
- [3] Marco, S.; Ortega, A.; Pardo, A.; Samitier, J.: Gas identification with Tin oxide sensor array and self-organizing maps: Adaptive Correction of sensor drifts. *IEEE Transactions on Instrumentation and Measurement* **47**, 904–907 (1997).
- [4] Hall, D. L.; Llinas, J.: An Introduction to Multisensor Data Fusion. *Proceedings of the IEEE* **85**, 6–23 (1997).
- [5] Woodring, J. P.; Edwards, P. A.; Chisholm, M. H.: HPLC of non-flavonoid phenols in Vidal Blanc wine using electrochemical detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **38**, 792–732 (1990).
- [6] Casella, I. G.; Colonna, C. Contursi, M.: Electroanalytical determination of some phenolic acids by high-performance liquid chromatography at gold electrodes. *Electroanalysis* **19**, 1503–1508 (2007).
- [7] Alonso, Á. M.; Dominguez, C.; Guillén, D. A.; Barroso, C. G.: Determination of antioxidant power of red and white wines by a nw electrochemical method and its correlation with polyphenolic content. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**, 3112–3115 (2002).
- [8] Abdel-Hamid, R.; Newair, E. F.: Electrochemical behavior of antioxidants: I. Mechanistic study on electrochemical oxidation of gallic acid in aqueous solutions at glassy-carbon electrode. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **657**, 107–102 (2011).
- [9] Khaleghi, B.; Khamis, A., Karray, F. O., Razavi, S. N.: Multisensor data fusion: A review of the state of the art. *Information Fusion* **14**, 28–44 (2013).
- [10] Whyte, D. H.: Multisensor data fusion In: *Springer Handbook of Robotics*. B. Siciliano; O. Khatib (Eds.). Springer 2008, p. 1–26.

-
- [11] Barr, S. W.; Guyer, L. K.; Weaver, M. J.: The dependence of the kinetics of some simple outer-sphere electrode reactions on the nature of the electrode material. *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry* **111**, 41–59 (1980).
- [12] Cocchi, M.; Hidalgo-Hidalgo-de-Cisneros, J. L.; Naranjo-Rodríguez, I.; Palacios-Santander, J. M.; Seeber, R.; Ulrici, A.: Multicomponent analysis of electrochemical signals in the wavelet domain. *Talanta* **59**, 735–749 (2003).
- [13] Zhang, X.; Jin, J.: Wavelet Derivative: Application in multicomponent analysis of electrochemical signals. *Electroanalysis* **16**, 1514–1520 (2004).
- [14] Wang, J.: *Analytical Electrochemistry* 2nd Edition. New York: Wiley-VCH. 2000 p. 28 – 99
- [15] Mabbott, G. A.: An introduction to cyclic voltammetry. *Journal of Chemical Education* **60**, 697–705 (1983).
- [16] Bard, A. J.; Faulkner, L. R.: *Electrochemical Methods. Fundamentals and Applications*. 2nd Edition. New York: Wiley 2001, p. 226 – 260
- [17] Jing, R. W.; Lau, K. M.; Hon, P. M.; Mak, T. C. W. Woo, K. S., Fung, K. P.: Chemistry and biological activities of caffeic acid derivatives from *Salvia miltiorrhiza*. *Current medicinal chemistry* **12**, 237–246 (2005).
- [18] Karabiberoglu, S. U.; Ayan, E. M.; Dersun, Z.: Electroanalysis of caffeic acid in red wine and investigation of thermodynamic parameters using an Ag nanoparticles modified poly(thiophene) film glassy carbon electrode. *Electroanalysis* **25**, 1933–1945 (2013).
- [19] Moghaddam, A. B. Ganjali, M. R.; Dinarvand, R.; Norouzi, P., Saboury, A. A., Moosavi-Movahedi, A. A.: Electrochemical behavior of caffeic acid at single-walled carbon nanotube:graphite-based electrode. *Biophysical Chemistry* **128**, 30–37(2007).
- [20] Molina, A.; Morales, I.: Comparison between derivative and differential pulse voltammetric curves of EC, CE and catalytic processes at spherical electrodes and microelectrodes. *International Journal of Electrochemical Science* **2**, 386–405 (2007).
- [21] Winqvist, F.; Wide, P.; Lundström, I.: An electronic tongue based on voltammetry. *Analytica Chimica Acta* **357**, 21–31 (1997).

- [22] Gosser Jr., D. K.: *Cyclic Voltammetry. Simulation and Analysis of Reaction Mechanism*. New York, VCH 1993.
- [23] Esteban, M.; Ariño, C.; Díaz-Cruz, J. M.: Chemometrics for the analysis of voltammetric data. *Trends in Analytical Chemistry* **25**, 86–92 (2006).
- [24] Cetó, X.; Gutiérrez, J. M.; Gutiérrez, M.; Céspedes, F.; Capdevila, J.; Mínguez, S.; Jiménez-Jorquera, C.; Vall del, M.: Determination of total polyphenol index in wines employing a voltammetric electronic tongue. *Analytica Chimica Acta* **732**, 172–179 (2012).
- [25] Palacios-Santander, J. M.; Cubillana-Aguilera, L. M.; Naranjo-Rodríguez, I.; Hidalgo-Hidalgo-de-Cisneros, J. L.: A chemometric strategy based on peak parameters to resolve overlapped electrochemical signals. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* **85**, 131–139 (2007).
- [26] Palacios-Santander, J. M.; Cubillana-Aguilera, L. M.; Cocchi, M.; Ulrici, A.; Seeber, R.; Naranjo-Rodríguez, I.; Hidalgo-Hidalgo-de-Cisneros, J.: Multicomponent analysis in the wavelet domain of highly overlapped electrochemical signals: Resolution of quaternary mixtures of chlorophenols using a peg-modified Sonogel–Carbon electrode. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* **91**, 110–120 (2008).
- [27] Raspor, B.; Pižeta, I.; Branica, M.: Comparative quantitative analysis of overlapping voltammetric signals. *Analytica Chimica Acta* **285**, 103–111 (1994).
- [28] Saurina, J.; Hernández-Cassou, S.; Fábregas, E.; Alegret, S.: Cyclic voltammetric simultaneous determination of oxidizable amino acids using multivariate calibration methods. *Analytica Chimica Acta* **405**, 153–160 (2000).
- [29] Pižeta, I.: Deconvolution of non-resolved voltammetric signals. *Analytica Chimica Acta* **285**, 95–102 (1994).
- [30] Pižeta, I.; Jeren, B.; Aleksić-Maslać, K.: Straight lines, windows and background current synthesis in deconvolution procedure. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **375**, 169–174 (1994).
- [31] Fernandes, S. C.; Zwirter de Oliveira, I. R. W.; Vieira, I. C.: A green bean homogenate immobilized on chemically crosslinked chitin for determination of caffeic acid in white wine. *Enzyme and Microbial Technology* **40**, 661–668 (2007).

- [32] Medina, I; Undeland, I.; Larsson, K., Storrø, I.; Rustad, T.; Jacobsen, Ch.; Kristinová, V. Gallardo, J. M.: Activity of caffeic acid in different fish lipid matrices: A review. *Food Chemistry* **131**, 730–740 (2012).
- [33] Touaibia, M. Jean–Francois, J.; Doiron, J.: Caffeic acid, a versatile pharmacophore: An overview. *Mini–Reviews in Medicinal Chemistry* **11**, 695–713 (2011).
- [34] Giacomelli, C.; Ckless, K.; Galato, D.; Miranda, F. S.; Spinelli, A.: Electrochemistry of acid aqueous solutions with pH 2.0 to 8.5. *Journal of the Brazilian Chemical Society* **13**, 332–338 (2002).
- [35] da Silva, L. F.; Stradiotto, N. R.; Oliveira, H. P.: Determination of caffeic acid in red wine by voltammetric method. *Electroanalysis* **20**, 1252 – 1258 (2008).
- [36] Trabelsi, S. K.; Tahar, N. B.; Abdelhedi, R.: Electrochemical behavior of caffeic acid. *Electrochimica Acta* **49**, 1647–1654 (2004).
- [37] Filik, H.; Çetintas, G. ; Avan, A. A.; Aydar, S., Koç, A. N., Boz, I.: Square–wave stripping voltammetric determinativ of caffeic acid on electrochemically reduced graphene oxide–Nafion composite film. *Talanta* **116**, 245–250 (2013).
- [38] Zhang, Y.; Liu, Y.; He, J.; Pang, P.; Gao, Y.; Hu, Q.: Electrochemical behavior of caffeic acid assayed with gold nanoparticles/graphene nanosheets modified glassy carbon. *Electroanalysis* **25**, 1230–1236 (2013).
- [39] Zeng, Ch. Ch.; Liu, Ch. F., Zeng, J.; Zhong, R. G.: Electrochemical synthesis of 6–arylsulfonyl caffeic acid derivatives in aqueous medium. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **608**, 85–90 (2007).
- [40] Bradshaw, M. P.; Barril, C.; Clark, A. C.; Prenzler, P. D.; Scollary A. C: Ascorbic acid: A review of its chemistry and reactivity in relation to a wine environment. *Critical Reviews in Food Science and Nutriion* **51**, 479–498 (2011).
- [41] Pisoschi, A. M.; Pop, A.; Negulescu, G. P.; Pisoschi, A.: Determination of ascorbic acid content of some fruit juices and wine by voltammetry performed at Pt and carbon paste electrodes. *Molecules* **16**, 1349–1365

- [42] Okiei, W.; Ogunlesi, M.; Azeez, L.; Obakachi, V.; Osunsanmi, M.; Nkenchor, G.: The voltammetric and titrimetric determination of ascorbic acid levels in tropical fruit samples. *International Journal of Electrochemical Science* **4**, 276–287 (2009).
- [43] de Quirós, A. R.-B.; Fernández-Arias, M.; López-Hernandez, J.: A screening method for the determination of ascorbic acid in fruit juices and soft drinks. *Food Chemistry* **116**, 509–512 (2009).
- [44] Erdurak-Kilic, C. S.; Uslu, B.; Ozgen, U.; Dogan, B.; Ozkan, S. A.; Coskun, M.: Anodic voltammetric behaviour of ascorbic acid and its selective determination in pharmaceutical dosage forms and some Rosa species of Turkey, *Journal of Analytical Chemistry* **61**, 1113–1120 (2006).
- [45] Weng, Y. Ch.; Lee, Y. G.; Hsiao, Y. L.; Lin, Ch. Y.: A highly sensitive ascorbic acid sensor using a Ni–Pt electrode, *Electrochimica Acta* **56**, 9937–9945 (2011).
- [46] Raoof, J. B.; Kiani, A.; Ojani, R.; Valiollahi, R.; Rashid-Nadimi, S.: Simultaneous voltammetric determination of ascorbic acid and dopamine at the surface of electrodes modified with self-assembled gold nanoparticle films. *Journal of Solid State Electrochemistry* **14**, 1171–1176 (2010).
- [47] Hu, I. F.; Kuwana, T.: Oxidative mechanism of ascorbic acid at glassy carbon electrodes. *Analytical Chemistry* **58**, 3235–3239 (1986).
- [48] Casella, I. G.; Colonna, Ch.; Contursi, M.: Electroanalytical determination of some phenolic acids by high-performance liquid chromatography at gold electrodes. *Electroanalysis* **19**, 1503–1508 (2007).
- [49] Yen, G. Ch.; Duh, P. D.; Tsai, H. L.: Antioxidant and pro-oxidant properties of ascorbic acid and gallic acid. *Food Chemistry* **79**, 307–313 (2002).
- [50] Verma, S.; Singh, A.; Mishra, A.: Gallic acid: Molecular rival of cancer. *Environmental and Toxicology and Pharmacology* **35**, 473–485 (2013).
- [51] Takemoto, J. K.; Davies, N. M.: Method development for β -glucogallin and gallic acid analysis: Application to urinary pharmacokinetic studies. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **54**, 812–816 (2011).
- [52] Yang, Z.; Zhang, D.; Long, H.; Liu, Y.: Electrochemical behavior of gallic acid interaction with DNA and detection of damage to DNA. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **624**, 91–96 (2008).

- [53] Luo, J. H.; Li, B. L.; Li, N. B., Luo, H. Q.: Sensitive detection of gallic acid based on polyethyleneimine-functionalized graphene modified glassy carbon electrode. *Sensors and Actuators B* **186**, 84–89 (2013).
- [54] Kilmartin, P. A.; Zou, H.; Waterhouse, A. L.: A cyclic voltammetry method suitable for characterizing antioxidant properties of wine and wine phenolics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **49**, 1957–1966 (2001).
- [55] Rodríguez, M. C.; Rivas, G. A.; Glassy carbon paste electrodes modified with polyphenol oxidase analytical applications. *Analytica Chimica Acta* **459**, 43–51 (2002).
- [56] Nagoaka, T.; Yoshino, T.: Surface properties of electrochemically pretreated glassy carbon. *Analytical Chemistry* **58**, 1037–1042 (1986).
- [57] Sousa, W. R.; da Rocha, C.; Cardoso, C. L.; Silva, D. H. S.; Zanoni, M. V. B.: Determination of the relative contribution of phenolic antioxidants in orange juice by voltammetric methods. *Journal of Food Composition and Analysis* **17**, 619–633 (2004).
- [58] Zhang, Z.; Lei, Ch.; Sun, W.; Liu, H.; Deng, J.: Electrochemical immobilization of horseradish peroxidase on an electro-activated glassy carbon electrode. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **419**, 85–91 (1996).
- [59] Zare, H. R.; Golabi, S. M.: Electrocatalytic oxidation of reduced nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) at a chlorogenic acid modified glassy carbon electrode. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **464**, 14–23 (1999).
- [60] Golabi, S. M.; Zare, H. R.: Electrocatalytic oxidation of hydrazine at glassy carbon electrode modified with electrodeposited film derived from caffeic acid. *Electroanalysis* **11**, 1293–1300 (1999).
- [61] *Handbook of Electrochemistry*. C. Zoski (Ed.). Elsevier, 2006
- [62] Antonov, A.; Grigorieva, G. Kanngießer, B.; Arkadiev, V.; Beckhoff, B.: HOPG-based optics. In: *Handbook of Practical X-ray Fluorescence Analysis*. B. Beckhoff et al. (Eds.). Springer 2006, p.143–157
- [63] Edwards, M. A.; Bertoncello, P.; Unwin, P. R.: Slow diffusion reveals the intrinsic electrochemical activity of basal plane highly oriented pyrolytic graphite electrodes. *The Journal of Physical Chemistry C* **113**, 9218–9223 (2009).

-
- [64] Engstrom, C. R: Electrochemical pretreatment of glassy carbon electrodes. *Analytical Chemistry* **54**, 2310–2314 (1982).
- [65] McCreery, R. L.; Carbon electrodes: structural effects on electron transfer kinetics. *Electroanalytical Chemistry* **17**, 221–234 (1991).
- [66] Carvalhal, R. F.; Freire, R. S.; Kubota L. T.: Polycrystalline Gold Electrodes: A Comparative Study of Pretreatment Procedures Used for Cleaning and Thiol Self-Assembly Monolayer. *Electroanalysis* **17**, 1251–1259 (2005).
- [67] Burke, L. D.; Buckley, D. T.; Morrissey, J. A.: Novel view of the electrochemistry of gold. *Analyst* **119**, 841–845 (1994).
- [68] Oesch, U.; Janata, J.: Electrochemical study of gold electrodes with anodic oxide films-II. Inhibition of electrochemical redox reactions by monolayers of surface oxides. *Electrochimica Acta* **28**, 1247–1253 (1983).
- [69] Hoogvliet, J. C.; Dijksma, M.; Kamp, B.: Electrochemical pretreatment of polycrystalline gold electrodes to produce a reproducible surface roughness for self-assembly: A study in phosphate buffer pH 7,4. *Analytical chemistry* **72**, 2016–2021 (2000).
- [70] Yang, Z.; Cortes, A. G.; Jourquin, G.; Viré, J. C.; Kauffmann, J. M.: Analytical application of self assembled monolayers on gold electrodes: critical importance of surface pretreatment. *Biosensors and Bioelectronics* **10**, 789–795, (1995).
- [71] Burke, L. D.; Nugent, P. F.: The electrochemistry of gold: I The redox behaviour of the metal in aqueous media. *Gold Bulletin* **30**, 43–53 (1997).
- [72] Motoo, S.; Furuya, J.: Electrochemistry of platinum single crystal surfaces. Part I. Structural change of the platinum(111) surface followed by an electrochemical method. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **172**, 339–358 (1984).
- [73] Hudská, V.; Janda, P.; Nesměrák, K.: New electrochemical cell for studies of phthalocyanines. In: *Proceedings of 5th ISC Modern Analytical Chemistry*. Prague, Charles University in Prague, Faculty of Science 2009, p. 29–33.
- [74] Diestrich, C.: Uncertainty, Calibration, and Probability. The Statistics of Scientific and Industrial Measurement. 2nd Edition. Philadelphia: A. Hilger, 1991.

-
- [75] Song, W.; Chen, Y.; Xu, J.; Tian, D. B.: A selective voltammetric detection for dopamine using poly (gallic acid) film modified electrode. *Chinese Chemical Letters* **21**, 349–352 (2010).
- [76] Ratner, B. D.: Pyrolytic carbon In: *Biomaterials science: An introduction to materials in medicine* 2nd Edition. Academic Press 2004, p. 171–180.
- [77] Klusáčková, M.: Charakterizace elektrody modifikované pyridinoporfyrinátovým filmem a její využití v elektrochemickém senzoru. *Diplomová práce*. Praha, UK PŘF 2011.